Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut in Marburg
- Lehrstuhl II -
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. F. Schneider

EINFLUSS VON AMINOADAMANTANEN AUF TRANSPORT UND SPEICHERUNG VON 5-HT UND ADENINNUKLEOTIDEN IN MENSCHLICHEN THROMBOZYTEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

HARTMUT STÖLTZING
aus Niederpöcking

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut in Marburg
- Lehrstuhl II -
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. F. Schneider

EINFLUSS VON AMINOADAMANTANEN AUF TRANSPORT UND SPEICHERUNG VON 5-HT UND ADENINNUKLEOTIDEN IN MENSCHLICHEN THROMBOZYTEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

HARTMUT STÖLTZING
aus Niederpöcking

Marburg 1978

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität
Marburg am 27. Januar 1978
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. med. F. Neurath
Referent: Prof. Dr. rer. nat. W. Wesemann
Correferent: Prof. Dr. med. R. Egbring

Inhaltsverzeichnis

A. EINLEITUNG 1

B. METHODEN 9

I. Chemikalien 9

II. Gewinnung menschlicher Thrombozyten und Meßmethodik 9

1. Versuchspersonen 9

2. Gewinnung des Plättchen reichen Plasmas 10

3. Herstellung der Thrombozytensuspension und Inkubation 10

4. Thrombozytenzählung 11

5. Bestimmung der Serotoninfreisetzung bzw. Aufnahme mittels radioaktiv markiertem (^{14}C)5-Hydroxytryptamin (5-HT) 12

6. ATP/ADP-Bestimmung 13

6.1 Vorbehandlung der Proben 13

6.2 Ansatz der Eichkurve 14

6.3 Umsetzung mit Pyruvatkinase 16

6.4 Extraktion des Luciferin-Luciferase-Systems 17

6.5 ATP/ADP-Messung 18

7. Ansatz der Pufferlösungen 19

III. Spezielle Versuchsanordnungen 19

1. Induktion der Freisetzungsreaktion 19

1.1 Abhängigkeit der Freisetzungsreaktion von der molaren Konzentration der Aminoadamantane 20

1.2 Zeitabhängigkeit der Freisetzungsreaktion 20

1.3 Temperaturabhängigkeit der Freisetzungsreaktion 20
2. Konzentrationsabhängigkeit der (^{14}C)5-HT-Aufnahme 21
3. Hemmung der (^{14}C)5-HT-Aufnahme 21
4. Untersuchungen zur Hemmung der Glykolyse und der Atmungskette 22
5. LDH-Bestimmung 22
6. Elektronenmikroskopie 23
Anhang: Berechnung 24

C. ERGEBNISSE 28
1. Konzentrationsabhängigkeit der Aminoadamantan-induzierten Freisetzung aus menschlichen Thrombozyten 28
1.1 Freisetzung durch 1-Aminoadamantan (D 1) 28
1.2 Freisetzung durch 1-Amino-3.5-dimethyladamantan (D 145) 30
1.3 Freisetzung durch D 145 nach Vorinkubation mit 1-Aminoadamantan 32
1.4 Freisetzung durch 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177) 33
2. Induktion der Freisetzungsreaktion in Abhängigkeit von der Zeit 34
2.1 Zeitabhängigkeit der Freisetzung durch 1-Aminoadamantan (D 1) 35
2.2 Zeitabhängigkeit der Freisetzung durch 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177) 36
3. Induktion der Freisetzungsreaktion in Abhängigkeit von der Temperatur 38

4. Gesamtgehalt menschlicher Thrombozyten an (^{14}C)5-HT, ATP und ADP 39
5. Kinetik der (^{14}C)5-HT-Aufnahme 42
6. Hemmung der (^{14}C)5-HT-Aufnahme in menschliche Thrombozyten 43
6.1 Hemmung der Serotoninaufnahme durch 1-Amino-adamantan (D 1) 44
6.2 Hemmung der Serotoninaufnahme durch 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177) 46
7. Untersuchungen zur Hemmung der Glykolyse und des Elektronentransportes 49
8. Lactatdehydrogenase-Messung 52
9. Elektronenmikroskopie 53

D. DISKUSSION 57

E. ZUSAMMENFASSUNG 75

Abkürzungsverzeichnis 77

F. LITERATUR 78

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546010_0045

A. EINLEITUNG

Thrombozyten sind 1-3 µ große, beim Menschen kernlose, diskoid geformte Blutelemente (ca 200.000/ mm^3 Blut), die lichtmikroskopisch aus dem sog. Hyalomer und dem Granulomer bestehen. Sie entstehen im Knochenmark aus Megakaryoblasten über Megakaryozyten, die nach der Bildung von Plättchenorganellen und demarkierenden Membranen in ca. 2000 Thrombozyten zerfallen (PIPER, 1974). Der zurückbleibende Kern des Megakaryozyten wird phagozytiert. Die Reifung, stimuliert durch noch unbekannte Thrombopoietine, benötigt 7 Tage. Die Lebensdauer der Thrombozyten beträgt 8 bis 10 Tage; ihr Tod tritt durch Alterung ein, dabei erfolgt der Abbau in der Milz. Ihre Hauptaufgabe erfüllen die Thrombozyten bei der Blutgerinnung. Außerdem können sie Bakterien und Fremdpartikel phagozytieren (EDER und GEDIGK, 1973).

Vermutlich wurden die Thrombozyten 1842 von DONNE´entdeckt, der sie "Globuline" nannte. ZIMMERMANN (1847) bezeichnete sie als "Elementarbläschen", welche dazu neigen, granuläre Aggregate zu bilden. OSLER (1874) erkannte, daß diese Teilchen eine eigene Zellpopulation des Blutes darstellen und nannte sie die "dritten geformten Blutbestandteile". Während VIRCHOW noch 1858 die Existenz der von ZIMMERMANN

beobachteten, geformten farblosen Blutteilchen bestritt, war ungefähr 25 Jahre später ein Großteil ihrer Funktion bekannt. Die ersten wissenschaftlichen Untersuchungen über Blutgerinnung wurden von HAYEM (1878) und noch genauer von BIZZOZERO (1882) durchgeführt. Während HAYEM die Thrombozyten noch für Mutterzellen der Erythrozyten hielt und sie als "Hämatoblasten" bezeichnete, hatte BIZZOZERO schon Megakaryozyten beobachtet, ohne jedoch ihre Rolle bei der Thrombopoese zu erkennen. Diese wurde erst von WRIGHT (1906) aufgezeigt. BIZZOZERO beschrieb die Adhäsion von Thrombozyten an eine verletzte Gefäßwandstelle als den ersten Schritt zur Thrombusbildung. Er hielt die Thrombozyten noch für kernhaltig, ebenso wie DEKHUYZEN (1901), der den Begriff "Thrombozyten" prägte. Im ersten Viertel des 19. Jahrhunderts wurden vornehmlich die Gerinnungseigenschaften (DE LANGE, 1912; FONIO, 1912-1913; FEISSLY, 1922-1923), die Physiologie (GOVAERTS und ROSKAM, 1921) und klinische Aspekte der Thrombozyten (DI GUGLIELMO, 1917; GLANZMANN, 1918) untersucht.

Die ersten elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden von WOLPERS und RUSKA (1939) durchgeführt. Die Form der Thrombozyten ist unter anderem abhängig von der Temperatur und vom Oberflächenkontakt und, wie schon REBUCK und seine Mitarbeiter er-

kannten (1961), auch vom zeitlichen Stadium der Aggregation. Außerdem spielt die Präparationsmethode eine Rolle. Normale Thrombozyten, die sofort im Plasma mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid fixiert wurden, sind scheibchenförmig mit einem Durchmesser von 1-3 µ, oft haben sie pseudopodienartige zytoplasmatische Ausläufer. Die dreischichtige Zellmembran ist ungefähr 8 nm dick und absorbiert an ihrer Außenfläche z.B. Mucopolysaccharide und Proteine (NAKAO und ANGRIST, 1968). Mikrotubuli, jeweils aus 12 filamentösen Untereinheiten bestehend (BEHNKE und ZELANDER, 1967), sind anscheinend für die Aufrechterhaltung der Zellform notwendig. Die früher als ß-Granula bezeichneten Mitochondrien (RINEHART, 1955) sind klein und haben wenig Cristae. Als Energiespeicher dienen die ca. 30 nm großen Glykogenpartikel. Vakuolen stehen über ein feines Kanälchensystem mit der Zelloberfläche in Kontakt und bilden so ein zelluläres Transportsystem (BEHNKE, 1968). α-Granula, 200-300 nm groß, mit einer Doppelmembran umgeben, enthalten hydrolytische Enzyme (DAY et al., 1969); in 100-300 nm großen Organellen, den "very dense bodies", die wie die α-Granula osmiophil, aber nur von einer Einfachmembran umgeben sind, fand man Serotonin (5-HT), Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosindiphosphat (ADP) (TRANZER et al., 1967; DA PRADA et al., 1968, 1972). Nach BERNEIS et al. (1970) werden 5-Hydroxy-

tryptamin (5-HT) und ATP in Form von Micellen mit einem hohen Molekulargewicht und einer 5-HT/ATP-Relation von 2-3 : 1 gespeichert. Den hohen Gehalt der Thrombozyten an energiereichem Adenosintriphosphat und seine Abnahme während der Gerinnung entdeckte BORN 1956. Durch Arbeiten von GAARDER et al. (1961) und HELLEM (1960) wurde die Rolle des ADPs als Induktor der normalen Thrombozytenaggregation gesichert. In den folgenden Jahren wurden weitere aggregationsauslösende Substanzen, die wahrscheinlich auch über eine Freisetzung von ADP wirken, gefunden, wie z.B.: Thrombin, Antigen-Antikörper-Komplexe, Latex-Partikel und Fibrinogen-Präparationen (KOWALSKI et al., 1964).

Serotonin, das biogene Amin des Tryptophans (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) (Abb. 1, S. 8), ist schon lange als vasokonstriktorische Substanz bekannt. 1949 wurde es von RAPPORT in kristalliner Form aus Rinderserum gewonnen und die chemische Struktur aufgeklärt. Mit Serotonin identisch ist das "Enteramin" der argentaffinen Zellen der Darmmukosa. Neben dem hohen Serotoningehalt verschiedener Hirnregionen, z.B. Epiphyse, Hypothalamus und Nucleus caudatus zeichnen sich auch Thrombozyten durch ihren hohen Gehalt an 5-HT aus (KUSCHINSKY, 1975). Der Konzentrationsgradient gegenüber Plasma beträgt 200 : 1 (STACEY, 1961). Serotonin, das im Gegensatz zum ADP nur eine rever-

sible Aggregation auslöst, wird von den Thrombozyten durch einen aktiven, spezifischen Transport aufgenommen (HARDISTY und STACEY, 1955; Stacey, 1961). Für diese Serotoninaufnahme wird ein Mechanismus in 2 Stufen angenommen (PLETSCHER et al., 1971); erstens ein aktiver, energieabhängiger Transport durch die äußere Zellmembran, zweitens eine passive Diffusion des Serotonins in die Speicherorganellen, wo es an wahrscheinlich präformierte Metall-ATP-Komplexe gebunden wird. Zum zeitlichen Beginn der Aufnahme folgt der Prozeß einer Michaelis-Menten-Kinetik (BORN und GILLSON, 1959). Außerdem können die Thrombozyten Adrenalin und Noradrenalin in einem jedoch geringeren Maße aufnehmen, wobei von BORN und SMITH (1970) ebenfalls ein aktiver Prozeß angenommen wird. Die Dopamin-Aufnahme ähnelt der des Serotonins (BOULLIN und O'BRIEN, 1970). Eine Vielzahl von Medikamenten ist imstande, die Serotoninaufnahme der Thrombozyten zu hemmen: z.B. Imipramin, Cocain, Chlorpromazin und Tryptamin (STACEY, 1961); Amphetamin und 1-Aminoadamantan (LEMMER, 1973); Fenfluramin (BUCZKO et al., 1975) und Reserpin (PLETSCHER, 1968).

Während der irreversiblen Aggregation, die u.a. durch ADP oder Thrombin ausgelöst werden kann, wird Serotonin zusammen mit ATP und ADP aus den Speicher-

organellen freigesetzt (HOLMSEN und DAY, 1970). GRETTE (1962) führte den Ausdruck der "release reaction" ein, um die explosionsartige Freisetzung von Serotonin und Adeninnukleotiden durch Thrombin zu charakterisieren. Während die durch Thrombin induzierte Ausschüttung nach 30 Sekunden beendet ist, verwendeten MÜRER et al. (1974) den Begriff auch für die durch Natriumfluorid hervorgerufene langsamere (10 Minuten) 5-HT-, ATP- und ADP-Freisetzung. Viele Substanzen, besonders Psychopharmaka, von denen manche auch Hemmstoffe der Serotoninaufnahme darstellen, lösen eine solche langsame Serotoninfreisetzung aus, ohne daß eine Aggregation erfolgt : z.B. Reserpin (PAASONEN und PLETSCHER, 1959); PLETSCHER, 1967; DA PRADA et al., 1968), Chlorpromazin (PAASONEN, 1964), Amphetamin und 1-Aminoadamantan (LEMMER, 1973) oder Fenfluramin (BUCZKO et al., 1975).

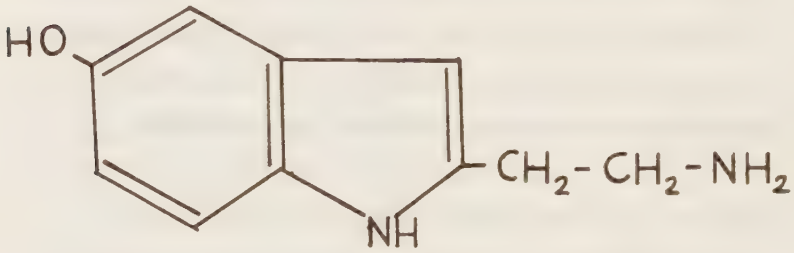
Da die Thrombozyten bezüglich der Ausschüttung, Aufnahme und Speicherung biogener Amine gewisse Ähnlichkeiten mit Nervenendigungen zeigen, werden sie als Modellzelle für Synaptosomen und Untersuchungen über Neurotransmitter und den Einfluß von Psychopharmaka betrachtet (PAASONEN et al., 1971).

1-Aminoadamantan ist ein stabiles, farbloses,

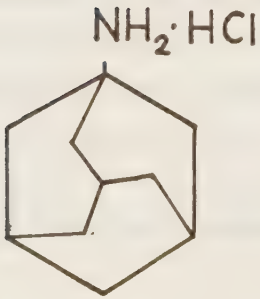
kristallines Amin mit ungewöhnlicher Käfigstruktur (Abb. 1). Es ist bekannt als antivirales Mittel, welches die Viruspenetration in die Zellen hemmt (DAVIES et al., 1964; GALBRAIGHT et al., 1969; MAASSAB et al., 1964). Außerdem wird es in der Therapie des Morbus Parkinson eingesetzt (SCHWAB et al., 1969), besonders bei L-Dopa-refraktären Fällen bzw. in der Kombination Aminoadamantan/L-Dopa bei der Behandlung akinetischer Krisen (DANIELCZYK, 1973). Es wird angenommen, daß die therapeutische Wirkung des Aminoadamantan auf einer Erhöhung der Dopaminsynthese und dessen Freisetzung in den Basalganglien beruht (GRELAK et al., 1970; SCATTON et al., 1970). An Synaptosomen aus Rattenhirn bewirkt 1-Aminoadamantan und sein Dimethylderivat D 145 (Abb. 1) in höheren Konzentrationen eine Ausschüttung des in ihnen gespeicherten Serotonins (WESEMANN und WILDENHAHN, 1975), in niedrigen Konzentrationen eine nicht-kompetitive Aufnahmehemmung (WESEMANN und SCHOLLMEYER, 1973; WILDENHAHN, 1976). An menschlichen Thrombozyten untersuchte LEMMER (1973) die Wirkung des 1-Aminoadamantan bezüglich der Aufnahme und Freisetzung von Serotonin; HAACKE und WESEMANN (1977) beschrieben die Wirkung des Dimethylderivates des 1-Aminoadamantans D 145.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist ein Ver-

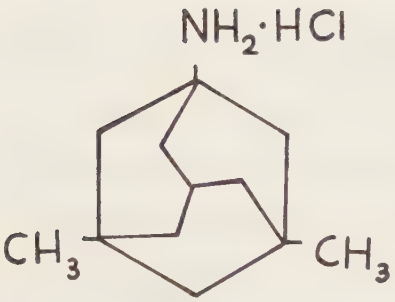
gleich der Wirkung des 1-Aminoadamantan (D 1) und seines Isopropylderivates D 177 (Abb. 1) auf menschliche Thrombozyten. Es wurde die Aufnahmekinetik des Serotonins und der Hemmeffekt der Aminoadamantane auf diese Aufnahme, sowie die Serotonin- und Adeninnukleotidfreisetzung durch D 1 und D 177 in Abhängigkeit von der molaren Wirkstoffkonzentration, der Zeit und der Temperatur untersucht. Die Energieabhängigkeit der Freisetzungsreaktion wurde durch Blockade der Glykolyse und der Atmungskette überprüft. Um eventuelle morphologische Veränderungen zu erfassen, wurden Thrombozyten auch elektronenmikroskopisch untersucht.



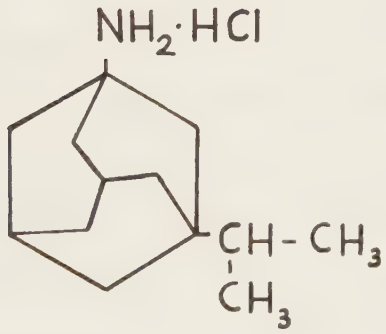
5-Hydroxytryptamin, Serotonin



1-Aminoadamantan
(D 1)



1-Amino-3.5-dimethyladamantan
(D 145)



1-Amino-3-isopropyladamantan
(D 177)

Abb. 1: Strukturformeln von 5-Hydroxytryptamin, 1-Aminoadamantan (D 1), 1-Amino-3-dimethyladamantan (D 145) und 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177)

B. METHODEN

I. Chemikalien

1-Aminoadamantan·HCl (D 1), 1-Amino-3.5-dimethyl-adamantan.HCl (D 145) und 1-Amino-3-isopropyladamantan ·HCl (D 177) wurden freundlicherweise von MERZ & CO zur Verfügung gestellt. 5-Hydroxy-(3-^{14}C)-tryptamin-kreatininsulfat (spez. Aktivität 54 mCi/mMol) stammte von der Firma AMERSHAM-BUCHLER, Braunschweig. Glühwürmchenextrakt, sogenannte "Desiccated Tails of Fireflies", wurde von SIGMA CHEMICAL CO., ST. LOUIS, MISSOURI bezogen, Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), Pyruvatkinase von Kaninchenmuskel, Phosphoenolpyruvat, Natriumpyruvat und reduziertes Nicotinamid-adenin-dinukleotid (NADH) bei BOEHRINGER MANNHEIM GMBH. Alle übrigen Chemikalien entsprachen p.a.-Qualität.

II. Gewinnung menschlicher Thrombozyten und Meßmethodik

1. Versuchspersonen

Von freiwilligen gesunden männlichen und weiblichen Blutspendern im Alter von 20 bis 30 Jahren wurden ca.80 ml Venenblut entnommen. Zur Standardisierung

fand die Blutentnahme zwischen 8 und 9 Uhr morgens statt. Es wurden Blutentnahmekanülen 1,1 x 30 mm der Firma BRAUN, Melsungen benutzt. Um eine Beschädigung der Thrombozyten zu vermeiden, wurde das Blut frei tropfend entnommen und in Plastikröhrchen in jeweils 2 ml 3,8 %iger Natriumcitratlösung, pH 7,4, aufgefangen (ca. 8 ml Blut pro Röhrchen).

2. Gewinnung des Plättchen reichen Plasmas (PRP)

Das Blut-Citratgemisch wurde 15 Minuten lang bei Raumtemperatur mit 1700 UpM (460 x g, max.) zentrifugiert. Für diesen und alle weiteren Zentrifugationsvorgänge wurde eine MSE-Tischzentrifuge "Super Minor" benutzt. Der Überstand (aus ca. 80 ml Blut ungefähr 20-25 ml PRP) wurde vorsichtig vom Blutkuchen abpipetiert, gesammelt und mit radioaktiv markiertem (^{14}C)5-HT (2,1 x 10^{-6} M) 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad mit einer Schüttelfrequenz von 82/Minute vorinkubiert.

3. Herstellung der Thrombozytensuspension und Inkubation

Nach der Inkubation der Thrombozyten mit (^{14}C) 5-HT wurde das PRP auf ca. 6 Plastikröhrchen verteilt, etwa 4-5 ml pro Röhrchen, 10 Minuten mit 2300-2400 UpM (860 x g) bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Sofort

nach Auslaufen der Zentrifuge wurden die Überstände dekantiert und verworfen, die Thrombozytenrückstände jeweils in 1 ml Waschlösung nach GAINTNER (1962) durch kurzes Whirlen suspendiert, mit 5 ml Waschlösung versetzt und erneut mit 2300-2400 UpM für 10 Minuten bei Zimmertemperatur abzentrifugiert. Wiederum wurden die Überstände sofort nach Auslaufen der Zentrifuge dekantiert und verworfen,und die Rückstände in 1 ml Inkubationslösung nach GAINTNER (1962) durch vorsichtiges Schütteln suspendiert. Die Proben wurden vereinigt und mit Inkubationslösung auf das für die Versuche erforderliche Volumen aufgefüllt (ca.10-15 ml). Nach Entnahme einer Probe zur Thrombozytenzählung wurde die auf diese Art gewonnene Suspension für die unter Teil III beschriebenen Inkubationen mit einem Aminoadamantanderivat verwendet. Diese Inkubationen wurden anschließend kurz in Eis gestoppt (ca.2 Minuten), und die Proben bei Raumtemperatur abzentrifugiert (3000 UpM, 1460 x g). Danach erfolgte die Serotonin- und ATP/ADP-Bestimmung.

4. Thrombozytenzählung

100 µl wurden als Thrombozytenzählprobe der zur Inkubation bestimmten Thrombozytensuspension entnommen, mit 0,9 ml Zähllösung (3,8 % Trinatriumcitrat x 2 H_2O, 1 % Formalin) 1:10 verdünnt und gut durchmischt. Eine

NEUBAUER-Zählkammer wurde mit einem Tropfen beschickt und zur Sedimentation der Thrombozyten 30 Minuten in einer feuchten Kammer aufbewahrt; 4 diagonal gelegene Quadrate à 0,04 mm^2 wurden ausgezählt. Durch Multiplikation mit 625 x 10^3 ergibt sich die Thrombozytenzahl pro ml Thrombozytensuspension (ca. 1-4 x 10^8 Thr./ml).

5. Bestimmung der Serotoninfreisetzung bzw. Aufnahme mittels radioaktiv markiertem (^{14}C)5-Hydroxytryptamin (5-HT)

Die Inkubation der Thrombozyten mit (^{14}C)5-HT erfolgte im PRP; (^{14}C)5-HT-Konzentration: 2,1 x 10^{-6} M; Vorinkubationszeit: 60 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad. Bei den Freisetzungsversuchen wurde 1 ml der Thrombozytensuspension mit 1 ml gelöstem Aminoadamantanderivat unter verschiedenen Bedingungen (s. Teil III) weiterinkubiert und, wie unter II.3 beschrieben, im Eisbad gestoppt und abzentrifugiert. - Bei den Aufnahmeversuchen fand keine Vorinkubation statt. - Danach wurden die Überstände dekantiert und die Zentrifugenröhrchen ausgewischt, um zurückgebliebene Radioaktivität zu entfernen. Alle folgenden Arbeitsgänge fanden unter Kühlung der Proben statt. Die Rückstände wurden unter Whirlen in 2 ml 0,02 N HCl lysiert, zur Zerstörung der Thrombozyten bei -25°C eingefroren und nach dem Auftauen nochmals gewhirlt. Je zwei 0,5 ml-

Proben sowohl der Überstände als auch der lysierten Thrombozyten wurden zur Messung der Radioaktivität in mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit nach BRAY (1960) gefüllte Zählgefäße überführt; bei der Messung erfolgte die Quenchkorrektur mit Hilfe eines externen Standards. (PACKARD Tri-carb Scintillations-Spektrometer, Mod. 3380/544)

6. ATP/ADP-Bestimmung

6.1 Vorbehandlung der Proben

Nach Entnahme der Proben zur radioaktiven (^{14}C) 5-HT-Bestimmung wurden jeweils 1 ml-Proben der lysierten Thrombozyten mit 0,5 ml 1,2 M eiskalter Perchlorsäure zur Eiweißfällung versetzt. Alle Proben standen 10 Minuten in Eis und wurden anschließend in der Kälte ($4^{o}C$) zentrifugiert (10 Minuten bei 3000 UpM, 1460 x g). Um die Überstände, die durch Abzentrifugieren der Thrombozyten gewonnen wurden (Absatz II.5), gleich zu behandeln, wurde mit ihnen analog verfahren. Nach der Zentrifugation wurden von den perchlorsauren Thrombozytenlysaten und Überständen jeweils 0,5 ml-Proben entnommen und mit 0,5 ml 0,2 N Tris/HCl-Puffer, pH 7,6, 1 Tropfen Phenolphtalein als Indikator und 0,2 ml 2 N KOH versetzt. Der Eiweißbodensatz wurde verworfen. Anschließend erfolgte die Einstellung des pH-Wertes mit verdünnter Säure (ca 0,5 N HCl) oder Lauge (ca 0,5 N

KOH) auf 7,6-7,8 im Eisbad. Die zugefügten Volumina wurden notiert und bei der Auswertung berücksichtigt. Zur Salzsedimentation ($KClO_4$) wurde nochmals zentrifugiert (3000 UpM, 1460 x g). Die dekantierten Überstände wurden entweder sofort weiter umgesetzt oder bei -25°C bis zur späteren Messung, maximal 3 Tage, gelagert.

6.2 Ansatz der Eichkurve

Zur Ermittlung des ATP/ADP-Gehaltes der Thrombozyten war es erforderlich, parallel zu jeder Versuchsreihe eine Eichkurve sowohl für ATP, als auch ADP aufzustellen. Dazu wurden 6,6138 mg ATP und 5,6544 mg ADP jeweils in 100 ml Aqua bidest gelöst (Konzentration: 120 nMol/ml). Aus dieser ATP- bzw. ADP-Stammlösung wurde mit H_2O eine Verdünnungsreihe mit 8 Konzentrationen hergestellt (1:1, 1:2, 1:4, 1:8 etc.). Jeweils 1 ml dieser ATP- bzw. ADP-Verdünnungen wurde mit 2 ml "PCA-Lösung" versetzt, in Eppendorfgefäße abgefüllt und bei -25°C bis zur Messung gelagert (maximal 2 Wochen). Zusammensetzung der "PCA-Lösung": 20 ml 1,2 N PCA und 50 ml 0,5 M Tris/HCl-Puffer, pH 7,6, wurden mit ca. 20 ml 2 N KOH auf pH 7,6-7,7 eingestellt, 10 Minuten in der Kälte abzentrifugiert (10.000 UpM, 12.050 x g, max. SORVALL, Rotor SS-34), der Bodensatz mit dem ausgefallenen Salz ($KClO_4$) wurde verworfen. Vergleicht man

die Zusammensetzung der "PCA-Lösung", mit der die Eichkurvenansätze behandelt wurden, mit der Vorbehandlung der zu messenden Proben in Absatz 6.1, so zeigt sich die Analogie des Vorgehens. Die so hergestellten Eichproben (Konzentrationsbereich 8 nMol/0,2 ml bis 0,00625 nMol/0,2 ml) wurden mit Pyruvatkinase umgesetzt (s. Absatz 6.3) und am AMINCO Chem. Glow Photometer gemessen (s. Absatz 6.4). Aus den gewonnenen Meßwerten wurde die Eichkurve für ATP und ADP erstellt (Abb. 2). ADP wurde bei der Umsetzungsreaktion voll-

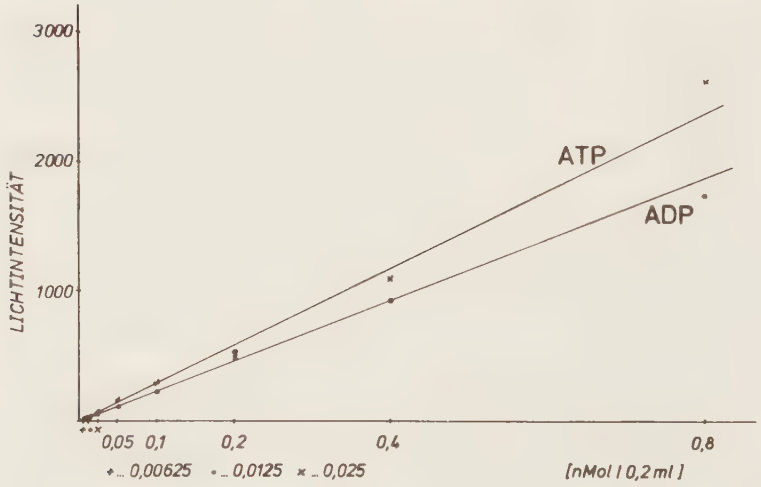


Abb. 2: Eichkurve zur ATP-/ADP-Bestimmung mit Hilfe der Luciferin-Luciferase-Methode

Die Chemolumineszenz wurde mit dem AMINCO Chem. Glow Photometer gemessen. Endkonzentration in den 0,2 ml-Meßproben nach der Umsetzungsreaktion 0,00625 nMol bis 0,8 nMol.

ständig in ATP umgesetzt, dennoch verlief die Eichkurve flacher, da ADP zu ca.25 % mit AMP verunreinigt ist, wie auch von BOEHRINGER angegeben. Der für die Berechnung des ATP- bzw. ADP-Gehaltes der Thrombozyten benötigte "Eichkurvenbezugswert" (s. ANHANG) wurde bei 0,1 nMol aus der ATP-Eichkurve abgelesen.

6.3 Umsetzung mit Pyruvatkinase

(modifiziert nach HOLMSEN et al., 1966, 1971)

Da mit dem Luciferin-Luciferase-System am AMINCO Chem. Glow Photometer nur ATP bestimmt werden kann, mußte in den für die ADP-Bestimmung vorgesehenen Proben zuvor das ADP in ATP umgewandelt werden:

$$\underset{\text{(PEP)}}{\text{Phosphoenolpyruvat}} + \text{ADP} \xrightarrow[\text{(PK)}]{\text{Pyruvatkinase}} \text{Pyruvat} + \text{ATP}$$

Die Umsetzung wurde mit aktiver gepufferter PEP-PK-Lösung durchgeführt. Diese setzte sich zusammen aus:

10 µl Pyruvatkinase, Aktivität: 200 E/mg

2 ml 0,2 M Trismaleatpuffer, pH 7,6

100 µl 10 mM PEP-Lösung: 4,653 mg PEP in 1 ml Lösung aus $MgSO_4$ 0,4 M (4,8592 g/100 ml) und KCl 1,3 M (9,6928 g/100 ml)

Mit aqua bidest wurde auf 25 ml aufgefüllt.

Die PEP-PK-Lösung wurde kurz vor Gebrauch hergestellt und mußte innerhalb von 5 Minuten zu den Proben für die ADP-Bestimmung pipettiert werden. Je 0,2 ml der

Proben wurden mit 2 ml aktiver PEP-PK-Lösung versetzt, 10 Minuten bei Raumtemperatur zur Enzymreaktion belassen, 6 Minuten auf 80°C erhitzt und danach im Eis abgekühlt. Die Proben, in denen das ATP direkt gemessen werden konnte, wurden ebenfalls mit PEP-PK-Lösung versetzt, welche allerdings zuvor durch 20-minütiges Erhitzen auf 80°C mit anschließendem Abkühlen inaktiviert worden war.

6.4 Extraktion des Luciferin-Luciferase-Systems

Die ATP/ADP-Bestimmung wurde mit einer Modifikation der von HOLMSEN et al. (1966, 1971) beschriebenen Firefly-Luciferase-Methode durchgeführt. Zur Extraktion wurden 75 mg "Desiccated Tails of Fireflies" mit etwas Seesand und einigen Tropfen gekühltem Arsenatpuffer (s.u.) in einem ebenfalls vorgekühlten Mörser zerrieben und mit 10 ml Arsenatpuffer aufgefüllt. Der Extrakt wurde 10 Minuten mit 3000 UpM (1086 x g, max.; SORVALL, Rotor SS-34) bei 4°C abzentrifugiert, und der Überstand mit $MgSO_4$ x 7 H_2O (49,3 mg/10 ml, 0,02 M) versetzt. Die erste Messung sollte erst nach 3-4 Stunden erfolgen, bis dahin muß das Luciferin-Luciferase-System bei 0-4°C im Dunkeln stehen. Der Firefly-Extrakt konnte für 2-3 Wochen bei -25°C aufbewahrt werden. Arsenat-Puffer: 0,1 M, pH 7,4; hergestellt aus $NaHAsO_4$ x 7 H_2O, pH-Einstellung erfolgte mit verdünnter (ca 0,5 N) H_2SO_4.

6.5 ATP/ADP-Messung

Zur Stabilisierung wurde das AMINCO Chem. Glow Photometer 30 Minuten vor Beginn der Messung eingeschaltet. Die Messungen wurden in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Mittels des Luciferin-Luciferase-Systems wurde die Lichtintensität folgender Reaktion gemessen:

Luciferin + ATP $\xrightarrow{\text{Luciferase}}$ Licht + ADP

Dazu wurden 5 cm lange Glasküvetten, Durchmesser von 5 mm, mit 0,1 ml des Firefly-Extraktes gefüllt und der Nullwert abgelesen. Mit einer 0,5 ml-Spritze wurden dann 0,2 ml von den zu messenden Proben möglichst gleichmäßig und schnell in die Küvetten gespritzt. Die Lichtausstrahlung erfolgt zwar über mehrere Minuten, erreicht aber 2 Sekunden nach der Injektion ihr Maximum, welches nach HOLMSEN et al. (1966) bis zu einer Konzentration von 2 µM dem ATP-Gehalt proportional ist. Während der gesamten Messung wurden sowohl Proben, als auch Firefly-Extrakt im Eisbad aufbewahrt.

7. Ansatz der Pufferlösungen

Nach GAINTNER et al. (1962) wurden angesetzt: Thrombozytenwaschlösung: 0,103 M NaCl; 0,04 M $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; 0,0047 M KH_2PO_4; 0,0005 M Glucose; 0,0129 M Na_3Citrat. Der pH wurde mit 0,04 M NaOH auf

einen Wert von 6,4 eingestellt. Die Thrombozyten-Inkubationslösung wurde ebenso angesetzt, lediglich der pH auf 7,4 eingestellt.

III. Spezielle Versuchsanordnungen

1. Induktion der Freisetzungsreaktion

Nach Vorinkubation menschlichen PRPs mit radioaktiv markiertem 2,1 x 10^{-6} M (^{14}C)5-HT (60 Minuten bei 37°C), Abzentrifugieren, Waschen und Resuspendieren in GAINTNER-Lösung (s. II.3) wurden im Schüttelwasserbad inkubiert: 1 ml Thrombozytensuspension + 1 ml eines in Inkubationslösung gelösten Aminoadamantanderivates. Die Inkubationsbedingungen wurden hinsichtlich der molaren Konzentration an Wirkstoff, der Zeit bzw. der Temperatur variiert. Folgende Substanzen wurden verwendet: 1-Aminoadamantan (D 1), 1-Amino-3.5-dimethyladamantan (D 145) und 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177). Proben ohne Wirkstoff wurden als Kontrollen mitinkubiert. Die Reaktion wurde durch 2-minütiges Kühlen bei 4°C beendet. Danach wurde die 5-HT-, ATP- und ADP-Freisetzung in Überstand und Thrombozytenlysat getrennt gemessen, wie unter Absatz II.5 und II.6 beschrieben, sowie die Thrombozytenzahl (s. II.4) bestimmt. Berechnung siehe unter ANHANG.

1.1 Abhängigkeit der Freisetzungsreaktion von der molaren Konzentration der Aminoadamantane

Thrombozyten wurden bei 37°C im Schüttelwasserbad für 30 Minuten inkubiert mit: 1-Aminoadamantan (D 1) im Bereich von 10^{-4} M bis 8 x 10^{-3} M, 1-Amino-3.5-dimethyladamantan (D 145) im Bereich von 10^{-3} M bis 8 x 10^{-3} M und 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177) im Bereich von 10^{-4} M bis 10^{-2} M. In einer Versuchsreihe wurde zunächst 30 Minuten bei 37°C mit 1-Aminoadamantan 8 x 10^{-3} M vorinkubiert, danach mit steigenden Konzentrationen D 145 (2 x 10^{-3} M, 4 x 10^{-3} M, 6 x 10^{-3} M, 8 x 10^{-3} M) eine 30-minütige Nachinkubation durchgeführt. Zur Kontrolle wurde mit 1-Aminoadamantan, 8 x 10^{-3} M, und mit D 145, 2 x 10^{-3} M, jeweils für 60 Minuten inkubiert.

1.2 Zeitabhängigkeit der Freisetzungsreaktion

Bei 37°C wurden menschliche Thrombozyten mit 1-Aminoadamantan in den Konzentrationen 3 x 10^{-3} M und 7 x 10^{-3} M, bzw. 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177) in den Konzentrationen 3 x 10^{-4} M und 10^{-3} M für 5, 10, 20 und 30 Minuten inkubiert.

1.3 Temperaturabhängigkeit der Freisetzungsreaktion

Mit 1-Aminoadamantan 6 x 10^{-3} M und 1-Amino-3-

isopropyladamantan (D 177) 5 x 10^{-4} M wurden menschliche Thrombozyten für 30 Minuten bei 0°C, Zimmertemperatur (20-22°C), 30°C, 33°C und 37°C inkubiert.

2. Konzentrationsabhängigkeit der (^{14}C)5-HT-Aufnahme

Bei diesen Versuchen wurde die 60-minütige Vorinkubation des PRP mit radioaktiv markiertem Serotonin nicht durchgeführt. Zur Ermittlung der Aufnahmekinetik wurde je 1 ml der Thrombozytensuspension mit (^{14}C)5-HT-Konzentrationen von 10^{-7} M bis 2,3 x 10^{-6} M inkubiert. Um den Anteil passiver Diffusion berücksichtigen zu können, wurden Kontrollen im Eisbad mitgeführt.

3. Hemmung der (^{14}C)5-HT-Aufnahme

Auch hier wurde keine Markierung des PRP vorgenommen. Zur Messung der Aufnahmehemmung wurde die Thrombozytensuspension mit steigenden 1-Aminoadamantan- (10^{-5} M - 10^{-3} M) und D 177-Konzentrationen (10^{-6} M - 10^{-4} M) inkubiert. Den mit Hemmstoff versehenen Thrombozytenproben wurden ohne Vorinkubation (^{14}C)5-HT-Konzentrationen zwischen 10^{-7} M und 2,3 x 10^{-6} M angeboten. In Parallelansätzen wurden Kontrollen ohne Hemmstoff bei 37°C und 4°C, sowie für jede Hemmstoffkonzentration eine Kontrolle bei 4°C mitinkubiert.

4. Untersuchungen zur Hemmung der Glykolyse und der Atmungskette

Zur Hemmung der Energiegewinnung in den Thrombozyten wurde ein Hemmstoff der Glykolyse, Monojodacetat, und ein Hemmstoff der Atmungskette, Natriumcyanid, verwendet.

Hemmstoffkombinationen (H):

H_1 : NaCN 10^{-2} M, Monojodacetat 5×10^{-3} M

H_2 : NaCN 5×10^{-3} M, Monojodacetat 5×10^{-3} M

H_3 : NaCN 10^{-3} M, Monojodacetat 5×10^{-3} M

Die Inkubation der Thrombozyten mit radioaktiv markiertem Serotonin erfolgte im PRP, wie unter II.3 beschrieben. Nach 30-minütiger Vorinkubation der Thrombozytensuspension mit den Hemmstoffkombinationen bei $37^{\circ}C$ wurde zur Induktion der Freisetzung 30 Minuten mit 1-Aminoadamantan (D 1) 5×10^{-3} M, bzw. mit 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177) 5×10^{-4} M bei $37^{\circ}C$ inkubiert. Kontrollen wurden 60 Minuten nur mit den Hemmstoffkombinatinonen aus NaCN und Monojodacetat behandelt. Um einen Vergleich mit einer nicht gehemmten Freisetzungsreaktion zu ermöglichen, wurden Proben aus der selben Thrombozytensuspension analog behandelt, nur ohne Zusatz von Hemmstoff.

5. LDH-Bestimmung

Nach Induktion der Freisetzungsreaktion (s. III.1)

mit 1-Aminoadamantan, 6 x 10^{-3} M, bzw. mit 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177), 5 x 10^{-4} M, wurde nach Zentrifugation der Thrombozytensuspension im Probenüberstand die Lactatdehydrogenase nach BERGMEYER (1970) bestimmt. Zum Vergleich diente die Messung der LDH im Überstand einer zuvor gefrorenen und wiederaufgetauten Thrombozytenprobe (30 Minuten bei -25°C). Serotonin wurde wie unter II.5 beschrieben bestimmt.

6. Elektronenmikroskopie

Zur elektronenmikroskopischen Erfassung der Aminoadamantanwirkung wurden menschliche Thrombozyten und solche von Kaninchen, an denen zuvor eine 5-HT-Freisetzung mit 1-Aminoadamantan, 8 x 10^{-3} M (30 Minuten bei 37°C), durchgeführt worden war, mit unbehandelten Thrombozyten verglichen. Gearbeitet wurde mit einem ELMISCOP I, SIEMENS. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen und Dokumentationen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Paul, Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, durchgeführt. Die Proben wurden mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid fixiert und mit Uranylacetat kontrastiert.

ANHANG

Berechnung :

ad III.1 Freisetzungsversuche

a) 5-HT-Freisetzung:

(^{14}C)5-HT wurde in jeder Versuchsprobe, wie unter II.5 beschrieben, im Überstand ($Ü_{Probe}$) und Thrombozytenrückstand (TR_{Probe}) gemessen. Auch bei den Kontrollen wurde der Serotoningehalt des Überstandes ($Ü_{Kontrolle}$) bzw. des Thrombozytenrückstandes ($TR_{Kontrolle}$) getrennt bestimmt. Die ZpM-Werte jedes Probenüberstandes wurden um den Mittelwert der Kontrollüberstände korrigiert ($Ü_{Probe} - Ü_{Kontrolle} = Ü_{korrigiert}$), um den nicht freisetzungsbedingten Anteil an Serotonin zu berücksichtigen. Der Anteil des nun korrigierten Überstandwertes an der Summe aus Thrombozytenrückstandswert + korrigiertem Überstandswert entspricht der Freisetzung in %. Da der Verdünnungsfaktor bei Überstand und Thrombozytenrückstand derselbe ist, spielt er in der prozentualen Auswertung keine Rolle.

$$(^{14}C)5\text{-HT-Freisetzung in \%} = \frac{Ü_{korrigiert}}{Ü_{korrigiert} + TR_{Probe}} \times 100$$

b) (^{14}C)5-HT-Gesamtgehalt:

Der Gesamtgehalt an ^{14}C-Serotonin in nMol/10^9

Thrombozyten berechnet sich aus der Summe von nicht korrigiertem Überstand und dazugehörigem Thrombozytenrückstand einer Probe ($TR_{Probe} + Ü_{Probe}$). Der Überstandswert wurde nicht korrigiert, um den durch die Suspension in GAINTNER-Lösung verlorengehenden (^{14}C)5-HT-Anteil mit zu erfassen. Die Berechnung erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\frac{\text{nMol 5-HT}}{10^9 \text{ Thrombozyten}} = ZpM \times \frac{\frac{\text{Mol } (^{14}C)5\text{-HT}}{ZpM} \times \text{Verd.faktor}^*}{\text{Thrombozytenzahl} \times 10^9 \text{ / ml}}$$

* Verdünnungsfaktor

c) ATP/ADP-Freisetzung:

Die Berechnung der ATP-Freisetzung in % erfolgte unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren. Die Überstandswerte wurden auch hier um die der Kontrollen korrigiert (wie bei der 5-HT-Freisetzungsberechnung). Da wegen der Meßbedingungen ADP in ATP umgesetzt wurde, mußten die eigentlichen ADP-Werte aus der Differenz (ATP + umgewandeltes ADP) - ATP zunächst ermittelt werden, bevor die prozentuale Berechnung erfolgen konnte.

d) ATP/ADP-Gesamtgehalt:

Zur Ermittlung des Gehaltes an ATP (bzw. ADP) in nMol/10^9 Thrombozyten wurden nur die Summen aus Überstands- und Thrombozytenrückstandswerten der Kontrol-

len verwendet, da sich der Gesamtgehalt bei der Freisetzungsreaktion erniedrigt (s. C, Absatz 4).

$$\frac{\text{nMol ATP}}{10^9 \text{ Thromb.}} = \frac{\text{Meßwert x Verdünnungsfaktor}}{\frac{\text{"Eichkurvenbezugswert"}}{\text{1 nMol ATP}} \times \frac{\text{Thromb.zahl x } 10^9}{\text{ml}}}$$

Thromb. ... Thrombozyten

ad III.4 Hemmung der Glykolyse und der Atmungskette

Da durch die 30-minütige Vorinkubation mit Hemmstoffen der Glykolyse ein beträchtlicher Ausstrom an 5-HT, ATP und ADP bestand (bis zu 70 % des Gesamtgehaltes), wurde die Berechnung der Freisetzung als Erniedrigung in % vom Thrombozytenrückstand der 60-Minuten-Kontrolle durchgeführt, d.h.: das, was an 5-HT, ATP bzw. ADP nach zusätzlicher Auslösung einer Freisetzungsreaktion noch im Thrombozytenrückstand einer Probe (TR_{Probe}) enthalten war, wurde dazu in Beziehung gesetzt:

$$\text{Freisetzung in \%} = \frac{TR_{60\text{-Min.-Kontrolle}} - TR_{Probe}}{TR_{60\text{-Min.-Kontrolle}}} \times 100$$

Min. ... Minuten

Die Berechnung der zum Vergleich durchgeführten Freisetzungen ohne Zusatz von Natriumcyanid und Monojodacetat erfolgte analog; hierbei wurde der (^{14}C)5-HT-, ATP- bzw. ADP-Gehalt von Thrombozyten gleich 100 %

gesetzt, die 60 Minuten lang nur in GAINTNER-Lösung inkubiert worden waren.

C. ERGEBNISSE

1. Konzentrationsabhängigkeit der Aminoadamantan-induzierten Freisetzung aus menschlichen Thrombozyten

1. Freisetzung durch 1-Aminoadamantan (D 1)

Die 30-minütige Inkubation der Thrombozytensus-

Tabelle 1: Konzentrationsabhängigkeit der Freisetzung von (^{14}C)5-HT, ATP und ADP aus menschlichen Thrombozyten durch 1-Aminoadamantan (D 1)

D 1 (mM)	SEROTONIN	ATP	ADP
0,1	3,3 ± 2,2 (4)	-0,8 ± 1,8 (4)	3,2 ± 5,5 (4)
0,5	13,3 ± 6,3 (3)	-2,7 ± 2,4 (3)	-3,0 ± 5,1 (4)
1	17,6 ± 7,2 (5)	-0,2 ± 3,4 (5)	-3,0 ± 4,3 (5)
2	27,7 ± 7,5 (7)	2,0 ± 6,5 (7)	3,2 ± 7,5 (7)
3	41,4 ± 6,9 (4)	-0,6 ± 3,6 (4)	1,0 ± 1,4 (5)
4	49,8 ± 7,7 (7)	0,1 ± 3,6 (7)	0,9 ± 8,8 (7)
5	56,5 ± 6,8 (5)	4,5 ± 3,9 (5)	-2,7 ± 4,3 (5)
6	62,6 ± 10,6 (7)	0,7 ± 4,5 (7)	7,4 ± 14,5 (7)
7	71,1 ± 10,7 (5)	6,1 ± 7,3 (5)	4,9 ± 19,7 (7)
8	74,8 ± 2,9 (7)	5,2 ± 9,2 (7)	10,7 ± 11,5 (7)

Alle Werte sind in % ± $s_{\bar{x}}$ des (^{14}C)5-HT-, ATP- und ADP-Gesamtgehaltes der Thrombozyten nach Korrektur um den Anteil der Spontanfreisetzung angegeben. Inkubationszeit: 30 Minuten bei 37°C. Die Standardfehler ($s_{\bar{x}}$) errechnen sich aus durchschnittlich 5 Versuchen.
(n) = Zahl der Einzelwerte.

pension bei 37°C mit 1-Aminoadamantan zeigte eine Konzentrationsabhängigkeit der Freisetzung des zuvor inkorporierten (^{14}C)5-HT (s. unter B 5.). Die Freisetzung begann bei einer Konzentration von 5 x 10^{-4} M 1-Aminoadamantan und erreichte bei 8 x 10^{-3} M einen Wert von 75 % des Gesamt-Serotoningehaltes der Thrombozyten

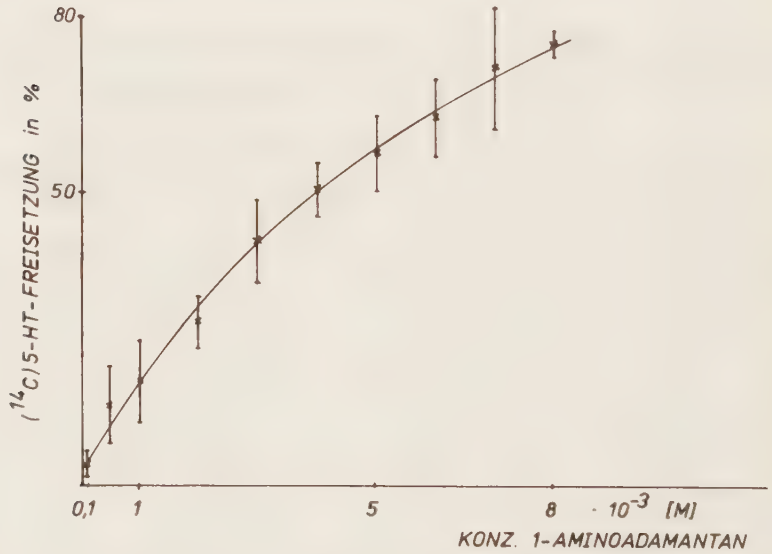


Abb. 3: Freisetzung von (^{14}C)5-HT aus menschlichen Thrombozyten durch 1-Aminoadamantan (D 1)

Nach 60-minütiger Vorinkubation von PRP mit 2,1 x 10^{-6} M (^{14}C)5-HT (spez. Aktivität 54 mCi/mMol), Zentrifugation, Waschen und Resuspendieren in GAINTNER-Lösung wurden menschliche Thrombozyten 30 Minuten bei 37°C mit 1-Aminoadamantan inkubiert. Der (^{14}C)5-HT-Gesamtgehalt der Thrombozyten wurde nach Korrektur um den Anteil der Spontanfreisetzung = 100 % gesetzt. Aufgetragen sind die Mittelwerte von 3-7 Versuchen und die Standardfehler der arithmetischen Mittel ($s_{\bar{x}}$).

(Abb. 3). Höhere Konzentrationen des 1-Aminoadamantan konnten wegen schlechter Löslichkeit im Inkubationsmedium nicht untersucht werden. Adeninnukleotide wurden durch 1-Aminoadamantan im gewählten Konzentrationsbereich nicht freigesetzt. Lediglich bei 8 x 10^{-3} M war eine geringgradige, jedoch nicht eindeutige Freisetzung von ATP und ADP festzustellen (Tab. 1).

1.2 Freisetzung durch 1-Amino-3.5-dimethyladamantan (D 145)

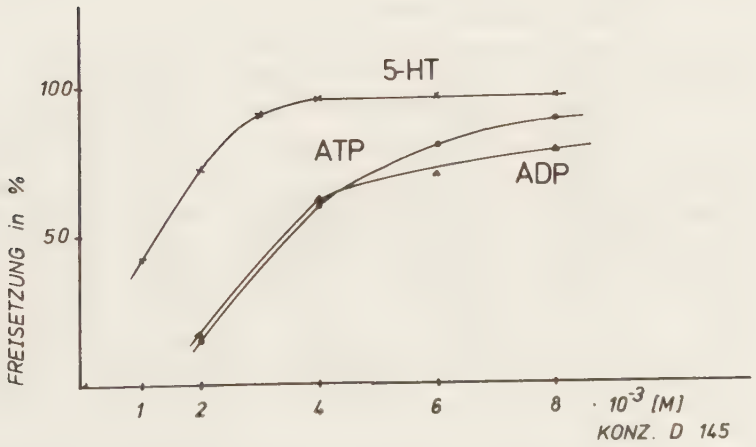


Abb. 4: Freisetzung von (^{14}C)5-HT, ATP und ADP aus menschlichen Thrombozyten durch D 145

Versuchsbedingungen, wie unter der Legende zu Abb. 3 angegeben. Aufgetragen wurden die Mittelwerte aus 2, bzw. für die Konzentrationen 2 x 10^{-3} M und 4 x 10^{-3} M aus 3 Versuchen. Der (^{14}C)5-HT-, ATP- bzw. ADP-Gesamtgehalt der Thrombozyten wurde nach Korrektur um den Anteil der Spontanfreisetzung = 100 % gesetzt.

(Konzentrationsbereich : 10^{-3} M - 8 x 10^{-3} M)

Nach 30-minütiger Inkubation menschlicher Thrombozyten, die zuvor mit (^{14}C)5-HT vorinkubiert worden waren, mit D 145 bei 37°C zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit sowohl der (^{14}C)5-HT-, als auch der ATP/ADP-Freisetzung (Abb. 4). Während die (^{14}C)5-HT-Freisetzung bei einer Konzentration von 10^{-3} M bereits 43 % betrug und bei 4 x 10^{-3} M in ein Plateau überging, begann eine weitgehend parallel verlaufende Ausschüttung der Ade-

Tabelle 2: Freisetzung von (^{14}C)5-HT, ATP und ADP durch D 145 nach Vorinkubation mit D 1

	(^{14}C)5-HT	ATP	ADP
D 1 (8 mM)	81,4 ± 5,8	1,9 ± 5,5	-2,7 ± 3,0
+D 145 (2 mM)	97,2 ± 0,6	32,2 ± 0,7	35,1 ± 2,8
D 1 (8 mM)	81,9 ± 3,4	1,5 ± 2,2	3,4 ± 1,6
+D 145 (4 mM)	97,7 ± 0,4	71,7 ± 4,5	65,3 ± 5,5
D 1 (8 mM)	81,7 ± 5,2	3,1 ± 3,4	3,1 ± 2,8
+D 145 (6 mM)	97,5 ± 0,4	88,7 ± 2,4	78,8 ±10,6
D 1 (8 mM)	82,3 ± 4,0	2,3 ± 4,6	8,0 ± 3,8
+D 145 (8 mM)	97,4 ± 0,1	94,1 ± 0,7	87,6 ± 1,7

Menschliche Thrombozyten, die, wie in Abb. 3 angegeben, (^{14}C)5-HT inkorporiert hatten, wurden 30 Minuten bei 37°C mit 1-Aminoadamantan und anschließend für weitere 30 Minuten mit 1-Amino-3.5-dimethyladamantan (D145) inkubiert. Alle Werte sind in % ± $s_{\bar{x}}$ des (^{14}C)5-HT-, ATP- und ADP-Gesamtgehaltes der Thrombozyten nach Korrektur um den Anteil der Spontanfreisetzung angegeben. Die Mittelwerte und die Standardfehler wurden aus 4 Messungen, bzw. bei ADP aus 3 Versuchen bestimmt.

ninnukleotide ATP und ADP erst bei 2 x 10^{-3} M. Hier wurde ein Plateau offenbar erst bei höheren Konzentrationen erreicht.

1.3 Freisetzung durch D 145 nach Vorinkubation mit 1-Aminoadamantan (D 1)

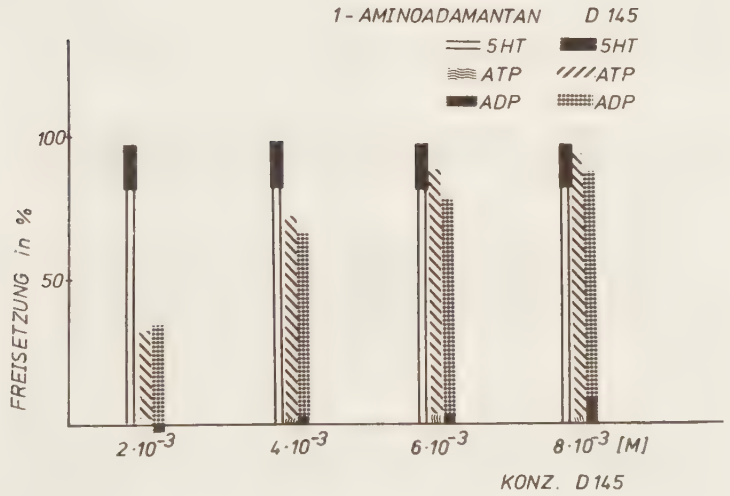


Abb. 5: Nachinkubation der mit 1-Aminoadamantan vorbehandelten Thrombozyten mit D 145

Zur Vorinkubation verwendete Konzentration an 1-Aminoadamantan: 8 x 10^{-3} M bei allen Proben. Inkubationszeit: 30 Minuten bei 37°C. Es wurde mit D 145 in steigenden Konzentrationen (s. Abszisse) 30 Minuten nachinkubiert. Sonstige Versuchsbedingungen, wie in der Legende zu Abb. 3 angegeben.
D 145-Effekt: Zusätzliche (^{14}C)5-HT-Ausschüttung ═, sowie mit 1-Aminoadamantan nicht zu erzielende deutliche ATP/ADP-Ausschüttung.

Nach der Vorinkubation menschlicher Thrombozyten mit 1-Aminoadamantan (D 1) (8×10^{-3} M, 30 Minuten bei 37°C), das selbst keine Adeninnukleotide freisetzte, konnte mit 1-Amino-3.5-dimethyladamantan (D 145) zusätzlich zu der Steigerung der (^{14}C)5-HT-Freisetzung von ca. 80 % auf ca. 97 % eine konzentrationsabhängige ATP/ADP-Ausschüttung induziert werden (Tab. 2, Abb. 5). Allerdings lag bei der zur Kontrolle durchgeführten 60-minütigen Inkubation mit 1-Aminoadamantan 8×10^{-3} M die (^{14}C)5-HT-Freisetzung auch bei 95 %, jedoch zeigte sich auch nach 60 Minuten keine ATP/ADP-Freisetzung.

1.4 Freisetzung durch 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177)

(Konzentrationsbereich: 10^{-4} M - 10^{-2} M)

Nach Inkubation menschlicher Thrombozyten mit dem 3-Isopropylderivat des 1-Aminoadamantans zeigte sich, wie beim Dimethylderivat D 145, eine Konzentrationsabhängigkeit sowohl der (^{14}C)5-HT- als auch der Adeninnukleotid-Freisetzung (Abb. 6). Die Serotoninfreisetzung begann bei 10^{-4} M und erreichte bei 6×10^{-4} M ein Plateau, während eine deutlich sichtbare ATP/ADP-Freisetzung erst bei 5×10^{-4} M zu verzeichnen war. Bei 4×10^{-3} M war ein Maximum der Ausschüttung aller drei Substanzen erreicht.

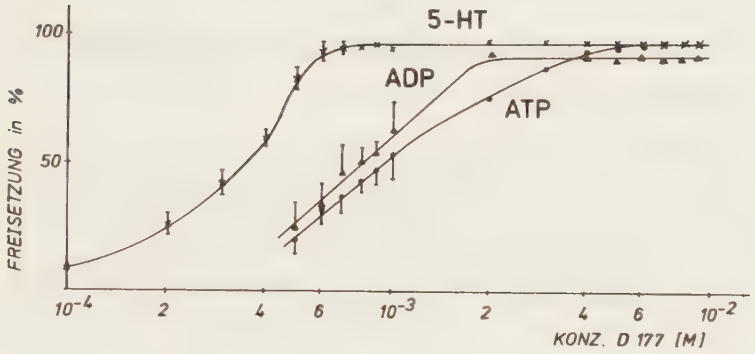


Abb. 6: Freisetzung von (^{14}C)5-HT, ATP und ADP aus menschlichen Thrombozyten durch 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177)

Versuchsbedingungen, wie in der Legende zu Abb. 3 angegeben. Aufgetragen wurden die Mittelwerte und die Standardfehler ($s_{\bar{x}}$) aus 2 bis 7 Versuchen. Der (^{14}C)5-HT-, ATP- bzw. ADP-Gesamtgehalt der Thrombozyten wurde nach Korrektur um den Anteil der Spontanfreisetzung = 100 % gesetzt.

2. Induktion der Freisetzungsreaktion in Abhängigkeit von der Zeit

Menschliche Thrombozyten wurden 5, 10, 20 und 30 Minuten mit den beiden 1-Aminoadamantanen bei 37°C inkubiert. Dabei wurden die Konzentrationen so gewählt, daß die niedrigere einer ungefähr halbmaximalen (^{14}C) 5-HT-Ausschüttung, die höhere einer maximalen nach den Ergebnissen der Versuche 1.1 und 1.4 entsprach. Im Falle des D 177 wurde die zweite Konzentration so ge-

wählt, daß neben der vollständigen Serotoninausschüttung eine ca. 50-prozentige Nukleotidfreisetzung zu erwarten war.

2.1 Zeitabhängigkeit der Freisetzung durch 1-Aminoadamantan (D 1)

Unter den eben genannten Bedingungen wurde die Inkubation mit 1-Aminoadamantan 3 x 10^{-3}M und 7 x 10^{-3} M durchgeführt. Die (^{14}C)5-HT-Freisetzung verlief relativ langsam. Nach 10 Minuten war bei beiden Kon-

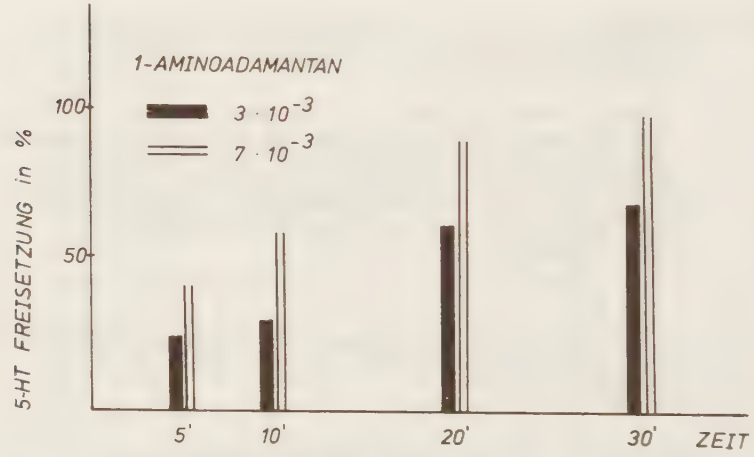


Abb. 7: Zeitabhängigkeit der Freisetzung von (^{14}C)5-HT durch 1-Aminoadamantan aus menschlichen Thrombozyten

Nach Vorbehandlung der Thrombozyten, wie in der Legende zu Abb. 3 beschrieben, erfolgte die Inkubation in GAINTNER-Lösung bei 37°C. Auftragung der Freisetzung in % des Serotonin-Gesamtgehaltes der Thrombozyten nach Abzug der Spontanfreisetzung. Mittelwerte aus 2 Versuchen.

zentrationen etwa die Hälfte des entsprechenden 30-Minuten-Wertes erreicht (Abb. 7). Ebenfalls lag bei beiden Konzentrationen der 20-Minuten-Wert fast auf gleicher Höhe mit dem 30-Minuten-Wert, d.h. zwischen 20 und 30 Minuten wurde ein Plateau erreicht, so daß mit einer weiteren (^{14}C)5-HT-Ausschüttung nicht zu rechnen war. Beim Vergleich der in Abb. 7 dargestellten 30-Minuten-Werte mit den Ergebnissen der Serotoninfreisetzung unter 1.1 fielen die Werte absolut gesehen etwas höher, in Relation untereinander jedoch gut vergleichbar aus. Die ATP/ADP-Messung ergab wiederum bei keinem Versuch eine Freisetzung der Adeninnukleotide, die Meßwerte entsprachen denen der Kontrollen.

2.2 Zeitabhängigkeit der Freisetzung durch 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177)

Als Konzentrationen, die den unter 2. genannten Bedingungen entsprechen, wurden 3 x 10^{-4} M und 10^{-3} M gewählt. Sowohl die (^{14}C)5-HT- als auch die ATP- und ADP-Freisetzung zeigte sich als zeitabhängige, relativ langsam verlaufende Reaktion. Erst nach 30 Minuten waren die nach Absatz 1.4 zu erwartenden Ausschüttungsergebnisse erreicht. Nach anfänglich steilerem, fast linearem Anstieg verlangsamte sich die Reaktion im Sinne einer Plateaubildung. Es zeigte sich bei der Inkubation mit D 177 3 x 10^{-4} M, daß

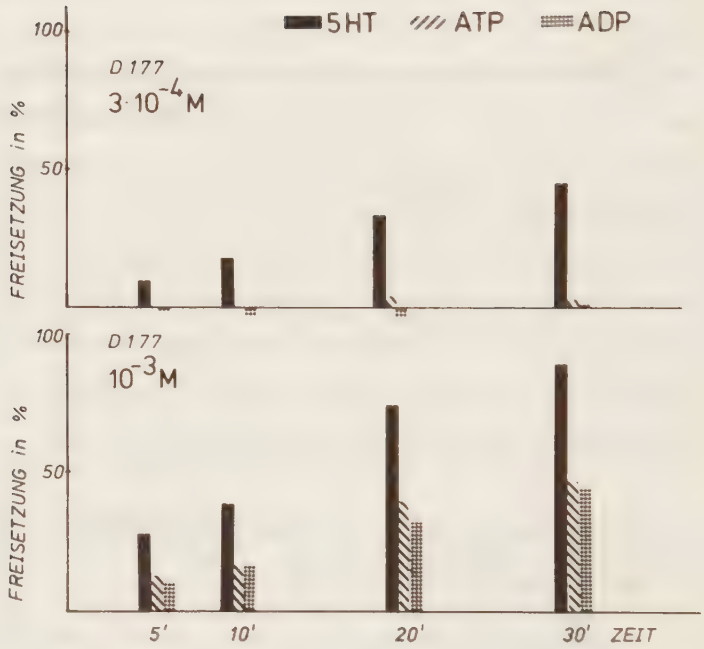


Abb. 8: Zeitabhängigkeit der Freisetzung von (^{14}C)5-HT, ATP und ADP aus menschlichen Thrombozyten durch 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177)

Nach Vorbehandlung der Thrombozyten, wie in der Legende zu Abb. 3 beschrieben, erfolgte die Inkubation in GAINTNER-Lösung bei 37°C. Auftragung der Freisetzung in % des 5-HT- ATP- bzw. ADP-Gesamtgehaltes der Thrombozyten nach Abzug der Spontanfreisetzung. Mittelwerte aus 2 Versuchen.

nach 10 Minuten, ähnlich wie beim 1-Aminoadamantan,

fast die Hälfte des 30-Minuten-Wertes erreicht wurde (Abb. 8). Eine Nukleotidfreisetzung wurde nicht gemessen, sie war bei dieser Konzentration nach Abb. 5 auch nicht zu erwarten. Bei der Inkubation mit D 177 10^{-3} M zeigte sich der der (^{14}C)5-HT-Freisetzung parallele Zeitverlauf der ATP/ADP-Ausschüttung.

3. Induktion der Freisetzungsreaktion in Abhängigkeit von der Temperatur

Bei 0°C, Zimmertemperatur (20-22°C), 30°C, 33°C und 37°C wurde mit 1-Aminoadamantan 6 x 10^{-3} M und 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177) 5 x 10^{-4} M inkubiert. Die Induktion der Freisetzungsreaktion zeigte eine klare Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur: bei 0°C und Zimmertemperatur ließ sich weder durch 1-Aminoadamantan, noch durch D 177 eine Reaktion auslösen, die Probenwerte lagen nur geringfügig über denen der Kontrollen (Abb. 9). Mit beiden Substanzen wurde bei 30°C zwar (^{14}C)5-HT ausgeschüttet, jedoch auch mit D 177 keine Nukleotide. Bei 33°C erreichte die Freisetzung der Adeninnukleotide, ähnlich der des Serotonins, schon fast vollständig das Niveau des 37°C-Wertes. Die Meßwerte bei 37°C zeigten gute Übereinstimmung mit den für dieselben Konzentrationen gewonnenen Ausschüttungswerten in % in Abb. 3 und 6. 1-Aminoadamantan (D 1) setzte keine Adeninnukleotide frei.

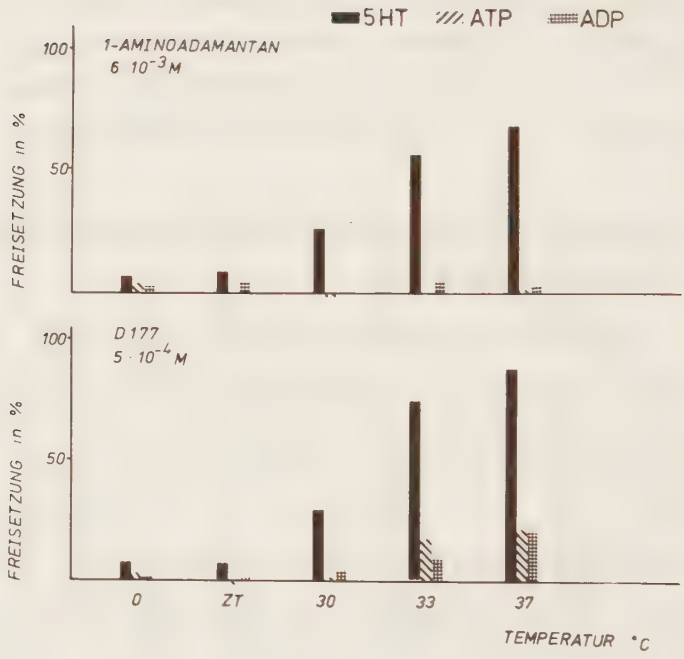


Abb. 9: Temperaturabhängigkeit der Freisetzung von (^{14}C)5-HT, ATP und ADP aus menschlichen Thrombozyten durch 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177)

Nach Vorbehandlung der Thrombozyten, wie in Legende zu Abb. 2 beschrieben, erfolgte die Inkubation für 30 Minuten. Auftragung der Freisetzung in % des (^{14}C)5-HT-, ATP- und ADP-Gesamtgehaltes der Thrombozyten nach Abzug der Spontanfreisetzung. Mittelwerte aus 5 Versuchen.

4. Gesamtgehalt menschlicher Thrombozyten an (^{14})5-HT, ATP und ADP

Tabelle 3 gibt Auskunft über die Akkumulation von

exogenem 5-HT, sowie die ATP- und ADP-Konzentrationen in menschlichen Thrombozyten in nMol/10^9 Thrombozyten und deren Quotienten. Der Gesamtgehalt errechnete sich jeweils aus den Werten für Thrombozyten und Überstand (genaue Berechnung s. unter B, Anhang). Zu dieser Berechnung wurden die Ergebnisse aus den Versuchen 1.1 und 1.4 herangezogen. Es ergab sich ein durchschnittlicher Gehalt an markiertem Serotonin von 11,5 nMol/10^9 Thrombozyten, der ATP-Gehalt betrug 66,1 nMol/10^9 Thrombozyten, der ADP-Gehalt 48,1 nMol/10^9 Thrombozyten, mithin der durchschnittliche Gesamtgehalt an Adeninnukleotiden 111,6 nMol/10^9 Thrombozyten. Daraus ergab sich eine ATP/ADP-Relation von 3:2. Diese Daten gelten für Thrombozyten, an denen keine Freisetzungsreaktion induziert wurde. Wurde (^{14}C)5-HT mit 1-Aminoadamantan oder 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177) freigesetzt, so änderte sich der Gesamtgehalt der Thrombozyten an Serotonin nicht. Wurde jedoch, wie mit D 177, auch ATP und ADP ausgeschüttet, so war eine Abnahme des Gesamtgehaltes an ATP um durchschnittlich 30 % zu verzeichnen, während sich der Gesamt-ADP-Gehalt um ca. 3 % vergrößerte. Damit reduzierte sich der Quotient Gesamt-ATP zu Gesamt-ADP, der vor der Freisetzungsreaktion 1,5 ± 0,2 betragen hatte, auf 0,9 ± 0,2 ($s_{\bar{x}}$). Das Verhältnis ATP zu ADP in den Überständen nach Auslösen einer Freisetzungsreaktion betrug 0,8 ± 0,09. Für diese Berechnung wurden nur Werte von Proben verwandt, bei denen eine

mindestens 35 %ige Adeninnukleotidausschüttung zu verzeichnen war.

Tabelle 3: Gesamtkonzentration an (^{14}C)5-HT*, ATP und ADP in menschlichen Thrombozyten

	nMol/10^9 Thrombozyten
(^{14}C)5-HT*	11,5 ± 0,8 (14)
ATP	66,1 ± 4,1 (14)
ADP	48,1 ± 5,2 (13)
ATP + ADP	111,6 ± 7,0 (13)
$\frac{\text{Gesamt-ATP}}{\text{Gesamt-ADP}}$	1,5 ± 0,2 (13)
$\frac{\text{Gesamt-ATP}}{\text{Gesamt-ADP}}$ nach Freisetzung durch D 177	0,9 ± 0,2 (6)
$\frac{\text{ATP + ADP}}{(^{14}\text{C})5\text{-HT*}}$	10,0
$\frac{\text{ATP}}{(^{14}\text{C})5\text{-HT*}}$	5,7
$\frac{\text{ATP}}{\text{ADP}}$ im Überstand nach der Freisetzungsreaktion mit D 177	0,8 ± 0,09 (7)

Mittelwerte ± $s_{\bar{x}}$ aus (n) Versuchen
* 60 minütige Inkubation von PRP mit (^{14}C)5-HT $2{,}1 \times 10^{-6}$ M.

5. Kinetik der (^{14}C)5-HT-Aufnahme

Die Kinetik der (^{14}C)5-HT-Aufnahme wurde im Konzentrationsbereich von 10^{-7} bis 2,3 x 10^{-6} M untersucht. Suspensionen menschlicher Thrombozyten in GAINTNER-Lö-

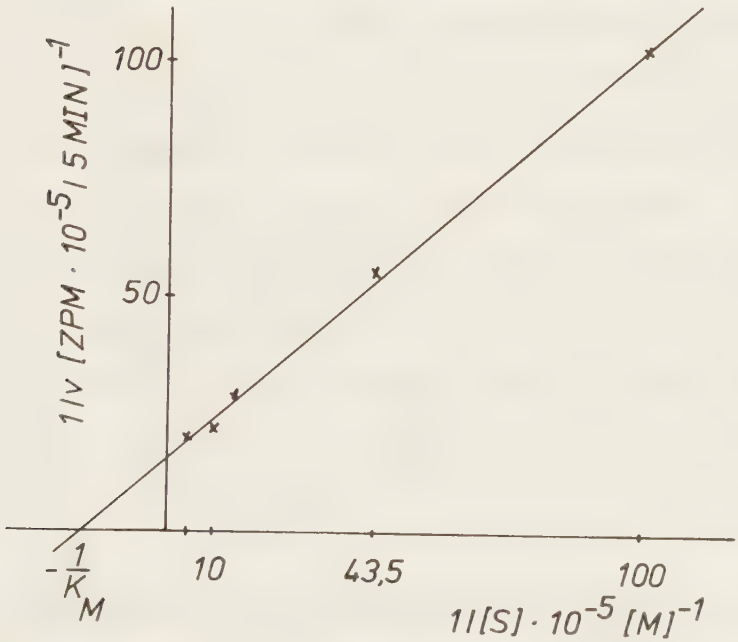


Abb. 10: Abhängigkeit der (^{14}C)5-HT-Aufnahme in menschliche Thrombozyten von der 5-HT-Konzentration

Eine Suspension menschlicher Thrombozyten in GAINTNER-Lösung wurde 5 Minuten bei 37°C mit Serotoninkonzentrationen von 10^{-7} bis 2,3 x 10^{-6} M inkubiert. Es wurde um den unspezifischen Anteil der (^{14}C)5-HT-Aufnahme korrigiert. Die Zeichnung repräsentiert die Werte für die spezifische Aufnahme eines Einzelversuches. Als Mittelwert aus 6 solchen Versuchen ergab sich $K_M = (7,4 \pm 3,2) \times 10^{-7}$ M ($s_{\bar{x}}$)

sung (s. unter B II, 3.) wurden dazu 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Diese Inkubationszeit wurde, genauso wie bei den nachfolgenden Hemmversuchen, deshalb gewählt, weil sie nach LEMMER (1973) eine lineare Beziehung zwischen der Serotoninaufnahme und der Zeit sicherstellt. Es zeigten sowohl der durch Kontrollen im Eisbad ermittelte unspezifische Anteil, als auch der spezifische Anteil der Gesamtaufnahme eine direkt proportionale Beziehung zur steigenden Serotoninkonzentration im Inkubationsmedium; der spezifische Anteil errechnete sich durch Subtraktion des unspezifischen von der Totalaufnahme. Zur Auftragung nach LINEWEAVER-BURK (1934) wurden die Regressionsgeraden berechnet. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse ergab die MICHAELIS-Konstante (Abb. 10). Aus 6 Versuchen wurde ein mittlerer K_M-Wert von $(7{,}4 \pm 3{,}2) \times 10^{-7}$ M ($s_{\bar{x}}$) ermittelt. Der entsprechende V_{max}-Wert lag bei 0,17 ± 0,02 nMol 5-HT/ 10^9 Thrombozyten/Minute.

6. Hemmung der (^{14}C)5-HT-Aufnahme in menschliche Thrombozyten

In diesen Versuchen wurden, ausgehend von den Ergebnissen der Freisetzungsreaktionen (s. 1.1; 1.4) Hemmstoffkonzentrationen gewählt, die noch keine, bzw. eine minimale Ausschüttung bewirkt hatten. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach LINEWEAVER-BURK (1934) und DIXON (1953).

6.1 Hemmung der Serotoninaufnahme durch 1-Aminoadamantan (D 1)

Zur Ermittlung des K_I-Wertes nach LINEWEAVER-

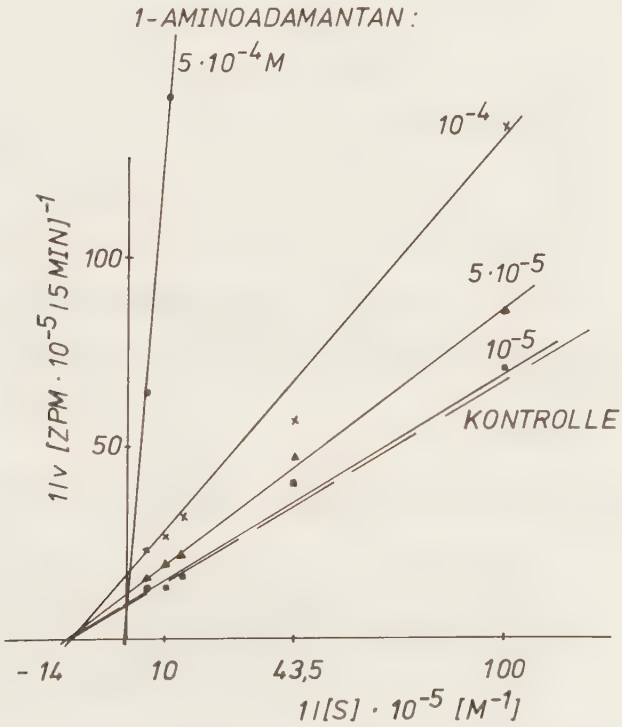


Abb. 11: Aufnahmehemmung von (^{14}C)5-HT in menschliche Thrombozyten durch 1-Aminoadamantan (D 1)

Auftragung nach LINEWEAVER-BURK. Die (^{14}C)5-HT-Konzentration wurde durch die angegebenen Konzentrationen an 1-Aminoadamantan gehemmt. Sonstige Versuchsbedingungen wie in der Legende zu Abb.10 beschrieben. Die Werte wurden um den unspezifischen Anteil der (^{14}C) 5-HT-Aufnahme korrigiert. Die Zeichnung repräsentiert einen Einzelversuch.

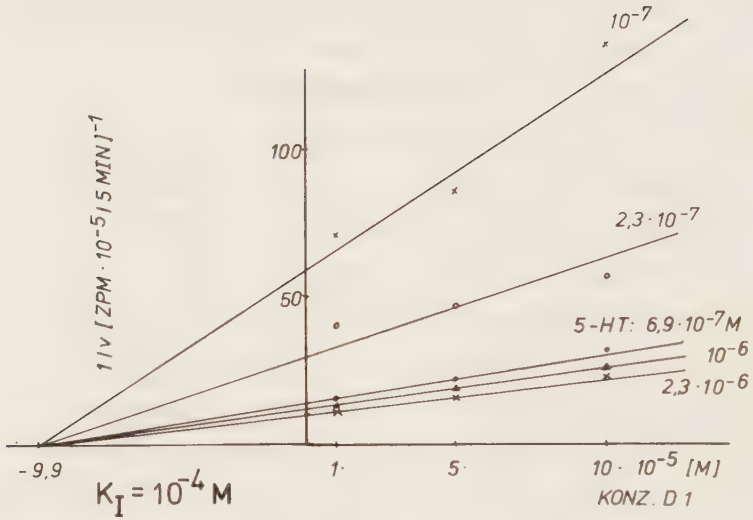


Abb. 12: Aufnahmehemmung von (^{14}C)5-HT in menschliche Thrombozyten durch 1-Aminoadamantan (D 1)

Auftragung nach DIXON. Die (^{14}C)5-HT-Inkorporation wurde durch die angegebenen Konzentrationen an 1-Aminoadamantan gehemmt. Sonstige Versuchsbedingungen wie in der Legende zu Abb. 10 angegeben. Die Werte wurden um den unspezifischen Anteil der (^{14}C)5-HT-Aufnahme korrigiert. Die Zeichnung repräsentiert einen Einzelversuch.

BURK (1934) wurden Hemmstoffkonzentrationen von 1-Aminoadamantan zwischen 10^{-5} M und 5 x 10^{-4} M gewählt. Die Serotoninkonzentrationen lagen zwischen 10^{-7} M und 2,3 x 10^{-6} M. Die Steigung der Geraden wurde aus der linearen Regression berechnet und die K_I-Werte

nach der Gleichung $K_I = i \left(\frac{v}{v_i} - 1\right)^{-1}$ für die beiden Hemmstoffkonzentrationen 5 x 10^{-5} M und 10^{-4} M bestimmt. Die Hemmstoffkonzentration 5 x 10^{-4} M wurde nicht berücksichtigt, da hier die auch nach Tabelle 1 zu erwartende Freisetzung von (^{14}C)5-HT begann (Abb. 11). Als mittlerer K_I-Wert ergab sich 1,3 x 10^{-4} M. Die Auftragung entsprach dem nicht-kompetitiven Typ. Die Auftragung nach DIXON bestätigte diesen Befund. Der gemeinsame Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse ergab einen K_I-Wert von 10^{-4} M (Abb. 12). Aus dem LINEWEAVER-BURK-Diagramm wurden die Werte für die prozentuale Hemmung der Serotoninaufnahmegeschwindigkeit (in diesem Versuch 0,18 nMol/10^9 Thrombozyten/Minute) ermittelt. Sie betrug für die 1-Aminoadamantankonzentrationen:

5 x 10^{-5} M	22 %
10^{-4} M	49 %

6.2 Hemmung der Serotoninaufnahme durch 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177)

Das Isopropylderivat des 1-Aminoadamantans erwies sich als stärkerer Hemmstoff; der Hemmtyp war ebenfalls nicht-kompetitiv. Es wurden für die D 177-Konzentrationen 10^{-6} M, 5 x 10^{-6} M und 10^{-5} M aus dem LINEWEAVER-BURK-Diagramm (Abb. 13) ein mittlerer K_I-Wert von 2,6 x 10^{-5} M ermittelt, die Auftragung

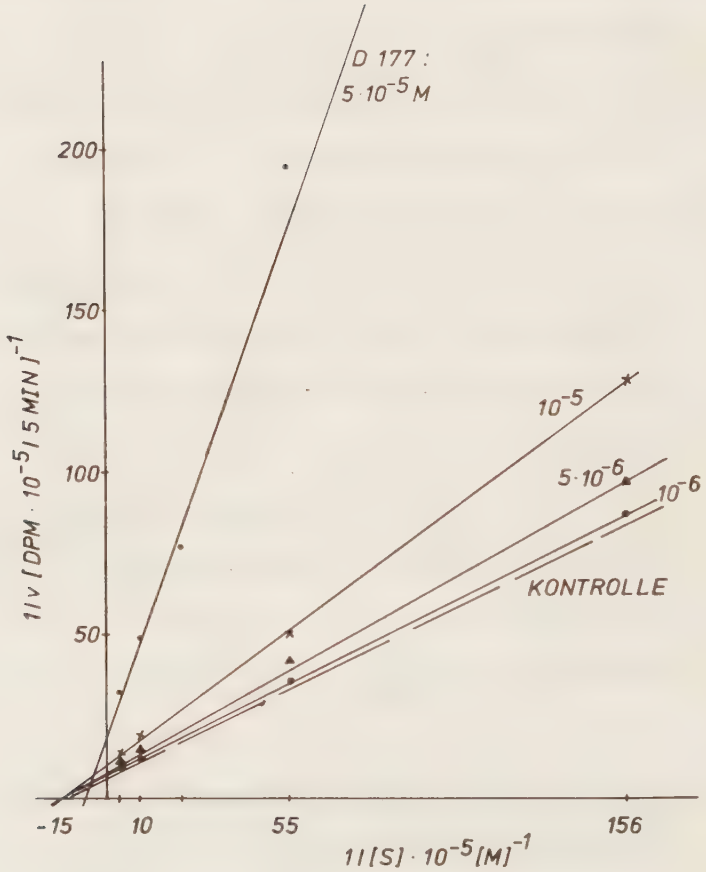


Abb. 13: Aufnahmehemmung von (^{14}C)5-HT in menschliche Thrombozyten durch D 177

Auftragung nach LINEWEAVER-BURK. Die (^{14}C) 5-HT-Inkorporation wurde durch die angegebenen Konzentrationen an 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177) gehemmt. Sonstige Versuchsbedingungen wie in der Legende zu Abb. 10 angegeben. Die Werte wurden um den unspezifischen Anteil der (^{14}C)5-HT-Aufnahme korrigiert. Die Zeichnung repräsentiert einen Einzelversuch.

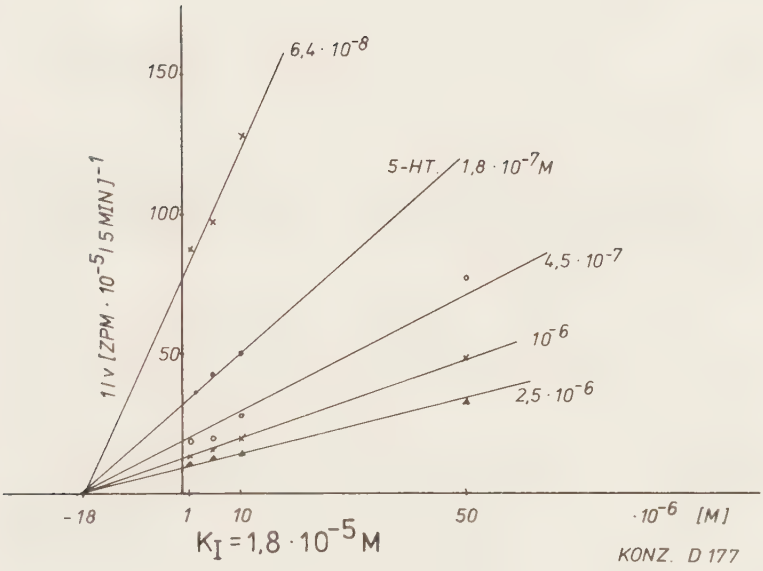


Abb. 14: Aufnahmehemmung von (^{14}C)5-HT in menschliche Thrombozyten durch D 177

Auftragung nach DIXON. Die (^{14}C)5-HT-Inkorporation wurde durch die angegebenen Konzentrationen an 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177) gehemmt. Sonstige Versuchsbedingungen wie in der Legende zu Abb. 10 angegeben. Die Werte wurden um den unspezifischen Anteil der (^{14}C)5-HT-Aufnahme korrigiert. Die Zeichnung repräsentiert einen Einzelversuch.

nach DIXON ergab einen K_I-Wert von 1,8 x 10^{-5} M (Abb. 14). Die aus den V_{max}-Werten errechnete Hemmung der Serotoninaufnahmegeschwindigkeit (in diesem Versuch 0,24 nMol 5-HT/10^9 Thrombozyten/Minute) betrug

bei 10^{-6} M 5,6 %

5×10^{-6} M 12,5 %

10^{-5} M 34,4 %

Bei 5×10^{-5} M begann anscheinend eine geringfügige (^{14}C)5-HT-Freisetzung (Abb. 13).

7. Untersuchungen zur Hemmung der Glykolyse und des Elektronentransportes

Zur Untersuchung über die Hemmbarkeit der Serotonin-, ATP- und ADP-Freisetzung durch 1-Aminoadamantan bzw. D 177 wurden menschliche Thrombozyten 30 Minuten bei 37°C mit 3 Hemmstoffkombinationen aus Monojodacetat (Glykolysehemmstoff) und Natriumcyanid (Hemmstoff des Elektronentransportes) vorinkubiert. Danach wurde mit 1-Aminoadamantan (D 1) 5×10^{-3} M bzw. 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177) 5×10^{-4} M unter weiterer Anwesenheit der Hemmstoffkombinationen 30 Minuten bei 37°C weiterinkubiert, um eine Freisetzungsreaktion auszulösen. Der Vergleich mit parallel durchgeführten Freisetzungsreaktionen durch 1-Aminoadamantan und D 177 ohne Hemmstoffvorinkubation ließ keine Hemmung der Serotonin-, ATP- oder ADP-Freisetzung erkennen (Tab. 4). Die Differenzbeträge zwischen gehemmten und ungehemmten Freisetzungsreaktionen, jeweils errechnet als Erniedrigung in % vom 5-HT-, ATP- und ADP-Gehalt des Kon-

Tabelle 4: Einfluß von Hemmstoffen der Atmungskette und der Glykolyse auf die durch Aminoadamantane induzierte Freisetzungsreaktion

1-Aminoadamantan 5×10^{-3} M

Hemmstoff-kombination	Serotonin %*	ATP %*	ADP %*
H_1	+6,8 ± 2,8	-0,4 ± 0,7	-1,1 ± 2,8
H_2	+3,2 ± 3,8	-3,7 ± 2,6	-0,2 ± 3,7
H_3	+3,3 ± 4,3	-3,3 ± 2,3	-0,1 ± 3,7

D 177 5×10^{-4} M

Hemmstoff-kombination	Serotonin %*	ATP %*	ADP %*
H_1	+9,9 ± 2,4	+4,2 ± 4,8	-3,4 ± 2,9
H_2	+3,5 ± 3,2	+6,2 ± 6,2	+11,2 ± 1,4
H_3	-4,5 ± 0,9	+6,9 ± 4,7	+14,5 ± 7,3

Alle Werte sind in % ± $s_{\bar{x}}$ angegeben, für Serotonin (n) = 4, für ATP und ADP (n) = 3. Es wurden menschliche Thrombozyten jeweils mit einer der drei folgenden Hemmstoffkombinationen des Energiestoffwechsels 30 Minuten bei 37°C inkubiert, und dann unter weiterer Anwesenheit der Hemmstoffe mit 1-Aminoadamantan bzw. D 177 während einer weiteren 30-minütigen Inkubation (37°C) eine Freisetzungsreaktion ausgelöst.
H_1 : NaCN 10^{-2} M, Monojodacetat 5×10^{-3} M
H_2 : NaCN 5×10^{-3} M, Monojodacetat 5×10^{-3} M
H_3 : NaCN 10^{-3} M, Monojodacetat 5×10^{-3} M
Zur Kontrolle des Hemmstoffeinflusses dienten Thrombozytenproben aus der gleichen Suspension, an denen eine Freisetzungsreaktion ohne Hemmstoffvorinkubation ausgelöst wurde. Das Außmaß der Freisetzung wurde in % errechnet (s. unter B, Anhang). Die Tabellenwerte sind Subtraktionsergebnisse aus gehemmten und ungehemmten Freisetzungen. Eine Hemmung der Freisetzungsreaktion wurde mit - bezeichnet, eine Verstärkung mit +.
* % = Differenzbetrag zwischen zwei in % ausgedrückten Freisetzungen

Tabelle 5: Verlust von Serotonin, ATP und ADP aus menschlichen Thrombozyten durch Inkubation mit Monojodacetat und Natriumcyanid

Hemmstoff-kombination	Verlust an Serotonin	ATP	ADP
H_1	65,2 %	47,6 %	49,6 %
H_2	63,3 %	39,4 %	37,8 %
H_3	55,1 %	38,4 %	34,8 %

60-minütige Inkubation menschlicher Thrombozyten bei 37°C mit den Hemmstoffkombinationen H_1, H_2, H_3 (s. Legende Tab. 8). Verlustwerte von Serotonin, ATP und ADP in % des Gesamtgehaltes. Durchschnittswerte aus 4 Versuchen für Serotonin, aus 3 Versuchen für ATP und ADP.

troll-Thrombozytenrückstandes (zur genauen Berechnung s. unter B, Anhang), lagen im Bereich der Schwankungsbreite. Die Proben, die 60 Minuten nur mit den Hemmstoffkombinationen inkubiert wurden, zeigten einen beträchtlichen Verlust an Serotonin, ATP und ADP. Der Ausstrom lag zwischen ca. 40 % und 70 % des Gesamtgehaltes der Thrombozyten, und es deutete sich an, daß mit höherer molaren Konzentration der Hemmstoffe des Energiestoffwechsels im Inkubationsmedium der Verlust zunahm (Tab. 5).

8. Lactatdehydrogenase-Messung

Um abzusichern, daß die (^{14}C)5-HT-, ATP- und ADP-Freisetzungen durch 1-Aminoadamantan (D 1) bzw. sein Isopropylderivat (D 177) nicht auf Zerstörung der Thrombozyten beruht, wurde nach der Freisetzungsreaktion (Durchführung wie unter C, 1.1 und 1.4 beschrieben) LDH im Überstand bestimmt. Bei der untersuchten Konzentration an 1-Aminoadamantan 6 x 10^{-3} M, bzw. D 177 5 x 10^{-4} M fand sich nur geringe LDH-Aktivität im Überstand, wie der Vergleich mit einer

Tabelle 6: LDH-Aktivität im Thrombozytenüberstand nach Auslösung der Freisetzungsreaktion durch 1-Aminoadamantan (D 1) bzw. 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177)

Substanz	5-HT-Freisetzung	LDH im Überstand
D 1 6 x 10^{-3} M	55,8 % (2)	2,9 mU/ml
D 177 5 x 10^{-4} M	47,5 % (3)	6,5 mU/ml
Lysierte Thrombozyten	-*	100,8 mU/ml

Mit 1-Aminoadamantan (D 1) und D 177 wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert, danach die LDH nach Abzentrifugation der Thrombozyten im so gewonnenem Überstand bestimmt. Der (^{14}C)5-HT-Gesamtgehalt der Thrombozyten wurde nach Abzug der Spontanfreisetzung = 100 % gesetzt. (n) = Zahl der Proben; -* = nicht bestimmt.

durch Frieren (30 Minuten bei -25°C) und Wiederauftauen zerstörten Thrombozytensuspension zeigte (Tab. 6).

9. Elektronenmikroskopie

Bei der 30-minütigen Inkubation menschlicher Thrombozyten und solcher vom Kaninchen mit 1-Aminoadamantan (D 1), 8 x 10^{-3} M, ergaben sich folgende Resultate: Aus menschlichen Thrombozyten wurde unter Berücksichtigung der Kontrolle ca. 60 % des Gesamt-(^{14}C)5-HT freigesetzt. Die Adeninnukleotidfreisetzung lag, wie nach den Ergebnissen von 1.1 zu erwarten war, im Kontrollbereich. Aus den Kaninchenthrombozyten wurde mehr (^{14}C)5-HT ausgeschüttet, eine eindeutige Adeninnukleotidfreisetzung bestand auch hier nicht, zumindest für ADP (Tab. 7). Nach Fixierung und Kontrastierung wurden die Thrombozytenrückstände elektronenmikroskopisch untersucht. Die Thrombozytenmembranen zeigten bei einem Abbildungsmaßstab von 1:60.000 keine gröberen Membranschäden (Abb. 14). Die semiquantitative Auswertung ergab nach Auszählen der "very dense bodies" bei einer Vergößerung von 1:4600 bis 1:7000 für die nicht mit 1-Aminoadamantan behandelten Kontollen bei menschlichen Thrombozyten: 66 5-HT-Speicherorganellen/250 Thrombozyten; beim Kaninchen: 300 Speicherorganellen/250 Thrombozyten. Die Anzahl der Speicherorganellen verringerte sich

Tabelle 7: Anzahl der 5-HT-Speicherorganellen in menschlichen und Kaninchen-Thrombozyten nach der 1-Aminoadamantan-induzierten Serotoninfreisetzung

Freisetzung aus menschlichen Thrombozyten:

Probe	5-HT	ATP	ADP	5-HT-Org./ 250 Thr.*
Kontrolle	10,7 %	13,7 %	6,9 %	66
D 1	70,4 %	14,3 %	5,9 %	42

Freisetzung aus Kaninchen-Thrombozyten:

Probe	5-HT	ATP	ADP	5-HT-Org./ 250 Thr.*
Kontrolle	7,1 %	13,5 %	11,8 %	300
D 1	92,6 %	23,6 %	15,8 %	162

30-minütige Inkubation der Thrombozyten vom Mensch bzw. Kaninchen bei 37°C in GAINTNER-Lösung mit 1-Aminoadamantan (D 1), 8 x 10^{-3} M. Semiquantitative Auswertung der Anzahl der Speicherorganellen durch Auszählen der "very dense bodies" und der Thrombozyten bei einer Vergrößerung von 1:4600 und 1:7000. Die 5-HT-, ATP- und ADP-Freisetzung wurde nicht um die aufgeführten Kontrollwerte korrigiert.
* 5-HT-Speicherorganellen/250 Thrombozyten

nach Auslösen einer 5-HT-Freisetzung mit 1-Aminoadamantan beim Menschen auf 42 Organellen/250 Thrombozyten, beim Kaninchen auf 162 Organellen/250 Thrombozyten. Somit ergab sich für unbehandelte menschliche Thrombo-

zyten ein Gehalt von 0-1 "very dense bodies" pro Thrombozyt, für unbehandelte Kaninchenthrombozyten ein Gehalt von ca. 1-2 Organellen pro Thrombozyt.

Abb. 15: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Kaninchenthrombozyten
Abbildungsmaßstab: 1:61.560. 30-minütige Inkubation der Thrombozyten mit 1-Aminoadamantan (8×10^{-3} M) bei 37°C. Fixation mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid, Kontrastierung mit Uranylacetat.

D. DISKUSSION

Es liegen zahlreiche Arbeiten über die Serotonin-Aufnahme bzw. Freisetzung aus menschlichen und tierischen Thrombozyten und deren Hemmung durch verschiedene Substanzen vor. Ein direkter Vergleich wird einerseits durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen erschwert, andererseits weisen Thrombozyten verschiedener Blutspender beträchtliche Schwankungen bezüglich ihres Serotonin- (HARDISTY und STACEY, 1955) und Adeninnukletidgehaltes auf (BORN et al., 1958). Deshalb zeigen sie, auch durch unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber der Präparationsmethode bedingt, unter konstanten Versuchsbedingungen große Schwankungsbreiten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hemmung der Serotoninaufnahme in menschliche Thrombozyten durch 1-Aminoadamantan (D 1) und 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177), sowie die Wirkung dieser beiden Substanzen auf die Freisetzung von 5-HT, ATP und ADP untersucht. Außerdem wurde die Energieabhängigkeit der Freisetzung überprüft und Thrombozyten elektronenmikroskopisch untersucht.

Die Thrombozyten haben die Fähigkeit, große Mengen an Serotonin gegen einen Konzentrationsgradienten aktiv aufzunehmen (BORN und GILLSON, 1959) und es in in dafür spezifischen Organellen, den "very dense bo-

dies" zusammen mit Adeninnukleotiden zu speichern (DA PRADA et al., 1968, 1972). Nach Inkubation mit Serotonin steigt der 5-HT-Gehalt der Thrombozyten auf das 2-5-fache des in vivo-Gehaltes bis zu einem Sättigungsniveau an (HARDISTY und STACEY, 1955). In dieser Arbeit ergab sich nach 60-minütiger Inkubation des PRPs mit radioaktiv markiertem 5-HT (2,1 µM) ein Gehalt an exogenem Serotonin von 11,5 nMol/10^9 Thrombozyten. Dies ist gut vergleichbar mit Werten von HARDISTY und STACEY (1955): 10,8 nMol/10^9 Thrombozyten (Inkubationszeit: 75 Minuten, 5-HT-Konzentration: 6,82 µM); mit BORN et al. (1958): 13,0 nMol/10^9 Thrombozyten (75 Minuten, 5-HT 6,8 µM); und mit STACEY (1961): 15,1 nMol/10^9 Thrombozyten (60 Minuten, 5-HT 13 µM). Die zitierten Autoren erfassen auch das endogene Serotonin, dessen Wert nach BORN et al. (1958) 3,4 nMol/10^9 Thrombozyten, nach HAACKE und WESEMANN (1977) 4,5 nMol/10^9 Thrombozyten beträgt. SZABADOS und MESTER (1975) wiesen eine beschleunigte 5-HT-Aufnahme nach Inkorporation von N-Acetylneuraminsäure in die Thrombozytenmembran nach: 10,5 nMol/10^9 Thrombozyten nach 5 Minuten (5-HT-Konz.: 5 µM).

Zu Beginn der Aufnahme steigt mit höheren Serotoninkonzentrationen im Inkubationsmedium die Aufnahmerate linear und folgt einer MICHAELIS-MENTEN-Kinetik. BORN und GILLSON (1959) bestimmten einen K_M-Wert von

3×10^{-7} M im PRP, LEMMER (1973) einen K_M-Wert von $3,8 \times 10^{-7}$ M ebenfalls im PRP. In dieser Arbeit wurde für die Serotoninaufnahmekinetik ein etwas höherer K_M-Wert von $7,4 \times 10^{-7}$ M ermittelt, allerdings nicht im PRP, sondern nach Suspension im Inkubationsmedium nach GAINTNER (1962).

Sowohl das 1-Aminoadamantan, als auch sein Isopropylderivat D 177 erwiesen sich als nicht-kompetitive Hemmstoffe der Serotoninaufnahme. Die Inhibitorkonstante $K_I = 1,3 \times 10^{-4}$ M für 1-Aminoadamantan steht in guter Übereinstimmung mit Befunden von LEMMER (1973), der ebenfalls eine nicht-kompetitive Hemmung durch 1-Aminoadamantan mit einem K_I-Wert von $1,6 \times 10^{-4}$ M angibt. Im gleichen Bereich liegen die K_I-Werte für das Dimethylderivat D 145, $K_I = 5 \times 10^{-4}$ M (HAACKE und WESEMANN, 1977), und das Methylderivat D 176, $K_I = 1,2 \times 10^{-4}$ M (MUSCHALEK, 1977). Als 10-fach stärkere Hemmstoffe zeigten sich das Isopropylderivat D 177, $K_I = 1,8 \times 10^{-5}$ M, und das Butylderivat D 178 (MUSCHALEK, 1977) mit einem K_I-Wert von $1,3 \times 10^{-5}$ M. So zeigt sich, daß mit steigender Kettenlänge des 3-C-Alkylrestes des 1-Aminoadamantans der Hemmeffekt zunimmt. Der Hemmtyp von D 176 und D 178 ist ebenfalls nicht-kompetitiv (MUSCHALEK, 1977). 1-Aminoadamantan und sein 3.5-Dimethylderivat D 145 sind als nicht-kompetitive Hemmstoffe der Serotonin-

bindung an synaptische Vesikel und Membranen beschrieben (WESEMANN und SCHOLLMEYER, 1973). Die dafür von WESEMANN und WILDENHAHN (1976) angegebenen K_I-Werte $5{,}7 \times 10^{-5}$ M (1-Aminoadamantan) bzw. 9×10^{-5} M (D 145) sind mit den an Thrombozyten gefundenen vergleichbar.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Bestimmung der Serotoninfreisetzung aus menschlichen Thrombozyten mit radioaktiv markiertem (^{14}C)5-HT, welches sie zuvor inkorporiert hatten. Diese Methode wurde verwendet, da die Freisetzung von akkumuliertem Serotonin und die Ausschüttung von endogenem Serotonin sich gleich verhalten (MASSINI, 1970), wobei das zuvor akkumulierte (^{14}C)5-HT anscheinend etwas leichter freigesetzt wird (HOLMSEN et al., 1973). Es liegt nahe zu vermuten, daß in beiden Fällen die Speicherung im selben Kompartiment erfolgt, da sich bei Freisetzungsversuchen mit D 145 ein Gleichverhalten des exogenen und des endogenen Serotonins zeigte (HAACKE und WESEMANN, 1977).

1-Aminoadamantan setzte dosisabhängig aus menschlichen Thrombozyten Serotonin frei, bei einer Konzentration von 8×10^{-3} M ca. 75 %. Eine höhere molare Konzentration konnte im gewählten Inkubationsmedium nach GAINTNER (1962) nicht erreicht werden. LEMMER

(1973) fand schon bei niedrigeren 1-Aminoadamantankonzentrationen eine 5-HT-Freisetzung, die bereits bei 10^{-3} M 65 %ig war. Diese Diskrepanz könnte sich durch die verschiedenen Inkubationsmedien (GAINTNER-Lösung bzw. Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer, pH 7,4 ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) erklären lassen, da sonst bezüglich der Methodik nicht unterschiedlich verfahren wurde. Mit 1-Aminoadamantan ließ sich bis zur Löslichkeitsgrenze keine eindeutige Freisetzung von Adeninnukleotiden bewirken, dies ist jedoch beim 1-Amino-3.5-dimethyladamantan (D 145) und beim 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177) der Fall. Die für die Serotonin- und Adeninnukleotidfreisetzung durch D 145 gefundenen Daten stimmen mit den von HAACKE und WESEMANN (1977) angegebenen überein. Als stärkere Freisetzungsszbstanz erwies sich D 177. Beim D 177 ist, wie beim D 145, zur Freisetzung von Adeninnukleotiden eine höhere Konzentration notwendig als zur Serotoninausschüttung, wobei mit D 177 eine ATP/ADP-Ausschüttung von 80-90 % des Gesamtgehaltes der Thrombozyten erreichbar war.

Da auf Grund der schlechten Löslichkeit von 1-Aminoadamantan (D 1) im GAINTNER-Inkubationsmedium eine höhere Konzentration als 8×10^{-3} M nicht zu erreichen und mit 1-Aminoadamantan (D 1) im Gegensatz zu D 145 keine Adeninnukleotidfreisetzung zu verzeichnen war, wurde nach Induktion einer Serotoninfreisetzung durch

D 1 mit D 145 in steigenden Konzentrationen nachinkubiert; dabei konnte durch D 145 eine zusätzliche Steigerung der Serotoninfreisetzung und eine konzentrationsabhängige Ausschüttung der Adeninnukleotide ATP und ADP bewirkt werden. Die Steigerung der Serotoninausschüttung ist anscheinend ein reiner Zeiteffekt, da nach 60-minütiger Inkubation ausschließlich mit D 1 die gleiche 5-HT-Menge wie bei 30-minütiger Nachinkubation mit D 145 ausgeschüttet wurde, wohingegen die Ausschüttung von ATP und ADP als spezifischer, durch das D 145 hervorgerufener Effekt gesehen werden muß.

Die Freisetzung von Serotonin und Adeninnukleotiden, die durch 1-Aminoadamantan bzw. sein Isopropylderivat hervorgerufen wird, zeigt einen relativ langsamen Zeitverlauf. Nach 30 Minuten ist die Freisetzung anscheinend nahezu beendet. Das Dimethylderivat verhält sich ähnlich (HAACKE und WESEMANN, 1977). Auch andere Substanzen bewirken ähnlich langsame Freisetzungen, z.B. das Natriumfluorid (Maximum nach 3-10 Minuten; MÜRER et al., 1974) oder das Fenfluramin (Zeitverlauf der 5-HT-Freisetzung bis zu 2 Stunden; BUCZKO et al., 1975).

Die durch D 1 und D 177 hervorgerufene Serotonin- bzw. auch Adeninnukleotid-Freisetzung aus Thrombo-

zyten ist von der Inkubationstemperatur abhängig. Die kritische Mindesttemperatur scheint bei 30°C zu liegen. Dies stimmt wiederum überein mit Befunden über das 1-Amino-3.5-dimethyladamantan (D 145) (HAACKE und WESEMANN, 1977).

Vergleicht man die Potenz des 1-Aminoadamantans mit der seines Dimethyl- (D 145) und Isopropylderivates (D 177), so liegt es nahe, eine verstärkte Wirkung mit zunehmender Länge der Substituentenkette zu vermuten. Untersuchungen über das 3-Methyl- (D 176) und das 3-Butylderivat (D 178) (MUSCHALEK, 1977) bestätigten diese Annahme. In der graphischen Darstellung (Abb. 16) wird deutlich sichtbar, daß die Freisetzung von Serotonin, ATP und ADP, bezogen auf die molare Konzentration an Wirkstoff, von der Länge der Seitenkette abhängig ist. Es zeigt sich, daß D 178, das Derivat mit der längsten Seitenkette, der stärkste Induktor der Freisetzungsreaktion ist (die (^{14}C)5-HT-Ausschüttung beginnt bereits bei 5 x 10^{-4} M), gefolgt von D 177 (Isopropylderivat), D 145 (Dimethylderivat) und D 176 (Methylderivat). Diese Rangordnung bleibt bei der Freisetzung der beiden Adeninnukleotide ATP und ADP gewahrt, jedoch liegen die für die jeweilige prozentuale Ausschüttung erforderlichen Wirkstoffkonzentrationen bei D 176 und D 178 (MUSCHALEK, 1977) um ca. eine Zehnerpotenz, bei D 145 und D 177 um ca.

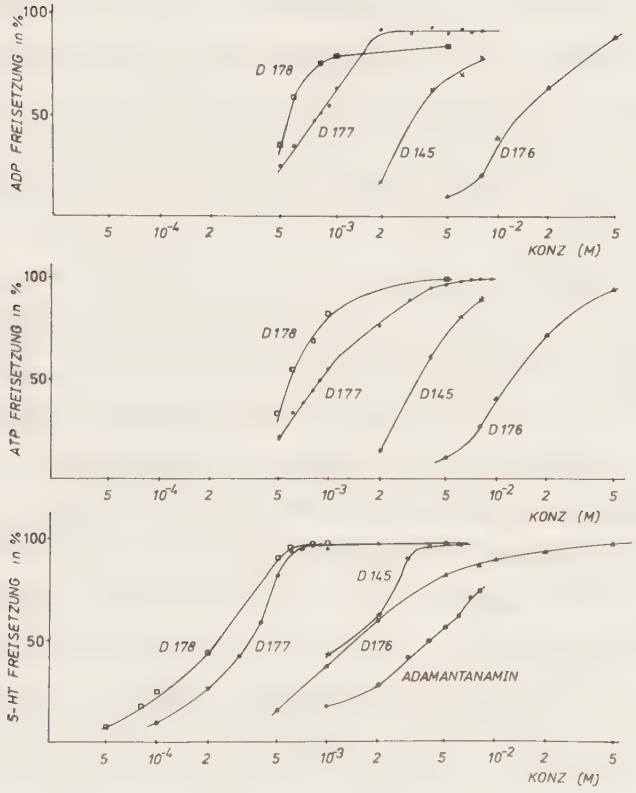


Abb. 16: Vergleich der Freisetzungsreaktion von (^{14}C) 5-HT, ATP und ADP aus menschlichen Thrombozyten durch 1-Aminoadamantan und seine Derivate

D 176: 1-Amino-3-methyladamantan
D 145: 1-Amino-3-dimethyladamantan
D 177: 1-Amino-3-isppropyladamantan
D 178: 1-Amino-3-butyladamantan
Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 37°C. Die Auftragung der Freisetzung erfolgte in % des (^{14}C)5-HT-, ATP- bzw. ADP-Gesamtgehaltes der Thrombozyten nach Abzug der Spontanfreisetzung

eine halbe Zehnerpotenz höher als bei der (^{14}C)5-HT-Freisetzung. Die Muttersubstanz, das 1-Aminoadamantan, stellt, wie auch aus der Abbildung ersichtlich, den schwächsten Induktor der Serotoninfreisetzung dar, eine ATP/ADP-Ausschüttung wird nicht bewirkt.

Der in dieser Arbeit gefundene Gehalt menschlicher Thrombozyten an Adenosintriphosphat (ATP) beträgt 66 nMol/10^9 Thrombozyten und an Adenosindiphosphat (ADP) 48 nMol/10^9 Thrombozyten. Beide Werte sind mit den in der Literatur angegebenen vergleichbar. BORN fand schon 1958, daß der ATP-Gehalt der Thrombozyten stark schwankt, bis um das 2,8-fache; er gab als Durchschnittswerte 43 nMol/10^9 Thrombozyten an. HOLMSEN und DAY (1971) publizierten Werte von 40-60 nMol ATP/10^9 Thrombozyten, HAACKE und WESEMANN (1977) geben 57 nMol ATP/10^9 Thrombozyten an. Für den ADP-Gehalt geben HAACKE und WESEMANN 33 nMol/10^9 Thrombozyten, HOLMSEN und DAY 20-40 nMol/10^9 Thrombozyten an. Ebensolche Schwankungen zeigen sich bei dem Quotienten Gesamt-ATP : Gesamt-ADP in intakten Thrombozyten. In dieser Arbeit betrug der Quotient 1,5 : 1. HAACKE und WESEMANN geben 1,8 : 1 an. Sie verwendeten dieselbe Modifikation der Luciferin-Luciferase-Methode nach HOLMSEN et al. (1966, 1971), die auch in der vorliegenden Arbeit benutzt wurde. In MAUPINs Monographie über Thrombozyten (1969) werden u.a. ATP/ADP-

Relationen von 3,1 : 1 (GROSS) und 5 : 1 (SCHMITZ) angegeben. Nach der Freisetzung durch D 177 findet man in den Überständen ein Verhältnis des freigesetzten ATPs zu ADP von 0,8. Die Änderung des ATP/ADP-Verhältnisses von 1,5 in intakten Thrombozyten zu 0,8 in den Überständen nach der Freisetzung spricht gegen eine Zellzerstörung und für eine Freisetzungsreaktion (HAACKE und WESEMANN, 1977); sie fanden einen Quotienten in den Überständen von 0,9 ; HOLMSEN und DAY (1969) von 0,78. Nach Inkubation der Thrombozyten im PRP mit radioaktiv markiertem Serotonin (2,1 µM, 60 Minuten) wurde ein Verhältnis von ATP zu exogenem, d.h. aufgenommenem Serotonin, von 5,7 gefunden. Bei BORN et al. (1958) wird dieses Verhältnis mit 3,2 angegeben. Dies ist keine Diskrepanz, da er das endogene Serotonin miterfaßte und mit einer höheren molaren Serotoninkonzentration (6,8 µM, 75 Minuten) inkubierte. Während der Freisetzungsreaktion durch D 177 verschwinden 30 % des ATP, ohne freigesetzt zu werden. HAACKE und WESEMANN (1977) fanden bei der Freisetzung durch D 145 einen ATP-Schwund von ca. 15 %. Offensichlich handelt es sich um einen ATP-Abbau aus dem metabolischen ATP-Pool, welches zu IMP und später zu Inosin und Hypoxanthin abgebaut wird und die Energie für die Freisetzungsreaktion liefert (HOLMSEN und DAY, 1969). Diese Autoren geben den ATP-Verlust bei der Freisetzungsreaktion durch Thrombin

mit 20 % an.

Um abzusichern, daß die (^{14}C)5-HT-, ATP- und ADP-Freisetzung durch 1-Aminoadamantan bzw. sein Isopropylderivat nicht auf Zerstörung der Thrombozyten beruht, wie dies z.B. durch Imipramin der Fall ist (GOODE und MELTZER, 1974), wurde nach Durchführung einer Freisetzungsreaktion die LDH-Aktivität im Überstand gemessen. Es zeigten sich nur geringe LDH-Aktivitäten, so daß gröbere Membranschäden als Ursache der 5-HT- und ATP/ADP-Freisetzung unwahrscheinlich sind; kleinere Membranschäden können jedoch nicht ausgeschlossen werden, da die Lactatdehydrogenase ein Enzym mit hohem Molekulargewicht darstellt.

Nach Behandlung der Thrombozyten mit 1-Aminoadamantan zeigten sich auch auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen hauptsächlich intakte Membranen. Für die Anzahl der Serotonin-Speicherorganellen geben DA PRADA (1967) und TRANZER (1966) nach semiquantitativer Auswertung von Dünnschnitten, auf 800 μ^2 Thrombozytenfläche berechnet, 360-380 "very dense bodies" in Kaninchen-Thrombozyten an und ca. 50 HT-Speicherorganellen/800 μ^2 Thrombozytenfläche für menschliche Thrombozyten. Rechnet man die in dieser Arbeit gefundenen Organellenzahlen (Mensch : 66/250 Thrombozyten; Kaninchen : 300/250 Thrombozyten) auf eine

Thrombozytenfläche von 800 μ^2 um, wobei ein mittlerer Thrombozytenradius von 1 μ angenommen wird, so ergeben sich Werte in ähnlicher Größenordnung. Sie sind aber mit den in der Literatur angegebenen Werten schlecht vergleichbar, da hier nur eine kleine Thrombozytenzahl aus nur einem Versuch ausgewertet wurde. Dies reicht aber aus, um das morphologische Korrelat der 1-Aminoadamantan-Wirkung zu beurteilen. Es zeigte sich, daß die Behandlung mit 1-Aminoadamantan zu einer Serotoninausschüttung ohne gleichzeitige Adeninnukleotidfreisetzung führte, und daß sich dabei die Anzahl der Speicherorganellen verminderte, in menschlichen wie in Kaninchen-Thrombozyten um ca.35-45 %.

Der Energiestoffwechsel wurde in dieser Arbeit durch Monojodacetat (5×10^{-3} M) und Natriumcyanid (10^{-2} M bis 10^{-3} M) blockiert. Monojodacetat hemmt die Glykolyse durch Blockade der Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase, Natriumcyanid blockiert den Elektronentransport in der Atmungskette. Die 5-HT- bzw. Adeninnukleotid-Freisetzung aus menschlichen Thrombozyten durch die beiden Aminoadamantane wurde dadurch nicht beeinflußt. Dies steht in Diskrepanz mit Ergebnissen von HAACKE und WESEMANN (1977), die mit den oben genannten metabolischen Inhibitoren eine Hemmung der Freisetzung durch 1-Amino-3.5-dimethyladamantan (D 145) und somit eine Energieab-

hängigkeit dieses Prozesses fanden. MÜRER et al. (1974) fanden eine sofortige Blockade der Natriumfluorid-induzierten Freisetzungsreaktion nach Zugabe von Antimycin, welches die Atmungskette hemmt; Natriumfluorid ist allerdings sowohl ein Freisetzungsreagenz, als auch ein Hemmstoff der Glykolyse. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind schwierig zu interpretieren. Nach Blockierung des Energiestoffwechsels durch Natriumcyanid und Monojodacetat sind sicherlich zwei verschiedene Effekte zu berücksichtigen: 1. Die Wiederaufnahme des während der 60-minütigen Hemmstoffinkubation passiv ausgeströmten Serotonins (bis zu 70 %) ist inhibiert, so daß im Vergleich zu den nicht mit NaCN/Monojodacetat inkubierten Kontrollen eine Serotoninausschüttung vorgetäuscht wird, ohne daß Aminoadamantane dem Inkubationsmedium zugesetzt wurden. 2. Durch die Hemmung der Atmungskette und der Glykolyse steht auch für die Freisetzungsreaktion weniger Energie zur Verfügung, so daß nach Zugabe der Aminoadamantane die aktive Serotoninausschüttung reduziert sein sollte. Da die Hemmung des Energiestoffwechsels hinsichtlich der Serotoninfreisetzung zwei entgegengesetzte Effekte auslöst - Hemmung der Rückresorption und Hemmung der Release-Reaktion - sind Vergleiche der Ergebnisse verschiedener Autoren und verschiedener Versuchsbedingungen wohl erst dann möglich, wenn durch detaillierte Un-

tersuchungen der Kinetik der Wiederaufnahme von passiv diffundiertem Serotonin in Gegenwart von Natriumcyanid und Monojodacetat eine quantitative Beschreibung dieses Teilschrittes möglich sein wird. Eine weitere Schwierigkeit bei der Auswertung der Versuche zur Hemmung des Energiestoffwechsels der Thrombozyten besteht darin, daß bei den angewendeten Hemmstoffkonzentrationen nach 60-minütiger Inkubation Adeninnukleotide aus den Thrombozyten freigesetzt werden (ca. 30-50 %), was auf eine Schädigung der Thrombozytenmembran hinweist. Die Ergebnisse der hier beschriebenen Versuche zur Energieabhängigkeit der Aminoadamantan-induzierten Freisetzungsreaktion machen deutlich, daß in weiteren Arbeiten zunächst Versuchsbedingungen gefunden werden müssen, die eine maximale Hemmung des Energiestoffwechsels ohne Schädigung der Thrombozytenmembran ermöglichen.

Wie bereits dargelegt, haben 1-Aminoadamantan (D 1) und 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177) die Fähigkeit, die Serotoninaufnahme in menschliche Thrombozyten konzentrationsabhängig und nicht-kompetitiv zu hemmen. Ob diese Hemmung eine spezifische ist oder ob sie sich auch auf die Aufnahme anderer Amine, wie Dopamin, Adrenalin oder Histamin erstreckt, ist bisher nicht untersucht worden. Der

Mechanismus der 5-HT-Aufnahmehemmung ist noch unbekannt; es ist nicht geklärt, ob die Aminoadamantane in das Zytoplasma des Thrombozyten gelangen, da bisher keine radioaktiv markierten Aminoadamantane zur Verfügung stehen - oder ob sie ihren Angriff an der Thrombozytenmembran entfalten. Man könnte eine Reaktion der Aminoadamantane mit Akzeptormolekülen der Thrombozytenmembran vermuten, die auf noch unbekanntem Wege den Serotonintransportmechanismus behindert. Dabei muß sich der Reaktionsmechanismus von dem des Imipramins unterscheiden, denn Imipramin, das seinen Angriffspunkt an der äußeren Thrombozytenmembran hat (PLETSCHER und TRANZER, 1967; TRANZER et al., 1966), hemmt die Serotoninaufnahme kompetitiv (STACEY, 1961). Daß die Aminoadamantanderivate sich mit steigender Kettenlänge des C-Alkylrestes auch als potentere Hemmstoffe erweisen, könnte durch bessere Lipidlöslichkeit in der Membran bedingt sein, die zu einer leichteren Bindung an einen postulierten Akzeptor führt. Es bleiben jedoch auch andere Möglichkeiten denkbar, etwa eine Beeinflussung der Na^+-K^+-ATPase oder von Ionenverhältnissen, die möglicherweise beim 5-HT-Transport durch die Membran eine Rolle spielen.

Während es bei niedrigen Konzentrationen an D 1 bzw. D 177 zu einer Hemmung der 5-HT-Aufnahme

in den Thrombozyten kommt, erfolgt bei steigenden Wirkstoffkonzentrationen zunächst eine Serotoninausschüttung ohne, dann mit gleichzeitiger Adeninnukleotidfreisetzung. Die Serotoninfreisetzung durch die Aminoadamantane ohne begleitende Adeninnukleotidfreisetzung könnte durch spontan freigesetztes Serotonin, welches nicht wiederaufgenommen wird, oder durch Erleichterung der passiven 5-HT-Diffusion bedingt sein. Den Freisetzungsmechanismus des 5-HT könnte man sich auch als Interferenz mit der 5-HT-ATP-Micellarstruktur in den "very dense bodies" vorstellen. Wird Serotonin zusammen mit Adeninnukleotiden freigesetzt, so ist es möglich, daß D 177 eine Release-Reaktion im Sinne von MÜRER et al. (1974) induziert, wie es auch von HAACKE und WESEMANN (1977) für das Dimethyderivat D 145 angenommen wird. Die Thrombozyten-Release-Reaktion hat nach HOLMSEN et al. (1969) folgende Kriterien: 1. Die freigesetzten Substanzen sind (soweit es bisher überprüft wurde) in den Granula der Thrombozyten lokalisiert, und zwar sowohl in den alpha-Granula, als auch in den "dense" Granula mit "bull-eyes" und den "very dense" Granula. 2. Substanzen, die entweder im Zytoplasma, in den Mitochondrien oder in den Membranen lokalisiert sind, bleiben bei der Release-Reaktion zurück. 3. Die maximale Freisetzung wird bei 30°C innerhalb von 60 Sekunden

erreicht; diese Forderung ist laut MÜRER et al. (1974) nicht mehr haltbar. 4. Der Prozeß ist energieabhängig. Die Energie wird durch Glykolyse und oxidative Phosphorylierung bereitgestellt. 5. Nach der Release-Reaktion nimmt der Thrombozyt einige seiner bekannten Funktionen beinahe normal wahr. 6. In vielen Fällen wird der Prozeß durch extrazelluläres Calcium gefördert. Legt man für den Wirkungsmechanismus des D 177 eine Release-Reaktion zu Grunde, so müßte dasselbe auch für die Muttersubstanz 1-Aminoadamantan gelten. Daß 1-Aminoadamantan jedoch kein ATP und ADP freisetzt, liegt wahrscheinlich daran, daß im GAINTNER-Inkubationsmedium die dafür benötigte Konzentration auf Grund schlechter Löslichkeit nicht erreicht werden konnte. Dennoch läßt sich ein möglicherweise unterschiedlicher Wirkungsmechanismus zum D 177 nicht sicher ausschließen.

Andererseits könnte die Wirkung der Aminoadamantanderivate durch einen Membraneffekt erklärbar sein, etwa derart, daß mit längerer Seitenkette und damit evt. steigender Lipidlöslichkeit zunächst Serotonin, mit zunehmender Porengröße auch Adeninnukleotide ausströmen, und daß es mit weiterer Steigerung der Wirkstoffkonzentration letztlich zu einer Zellzerstörung kommt. Für die Annahme, daß

die Aminoadamantane eine Release-Reaktion auslösen, sprechen die Konzentrations-, Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Reaktion. BERNEIS et al. (1970) zeigten, daß bei niedrigeren Temperaturen die Speicheraggregate aus Aminen und ATP stabiler sind; dies könnte dafür verantwortlich sein, daß die Aminoadamantane bei niedrigeren Temperaturen weniger wirksam sind. Die veränderten ATP/ADP-Quotienten, die man in intakten Thrombozyten und im Überstand nach der Freisetzungsreaktion durch D 177 findet, zeigen, daß keine Zellzerstörung stattgefunden hat, sondern, daß vermutlich die Speicherorganellen entleert wurden. Auch die geringen LDH-Aktivitäten im Überstand sprechen gegen massiven Membranschaden. Obwohl die Frage nach der Energieabhängigkeit der Reaktion auf Grund der Versuche mit metabolischen Inhibitoren der Glykolyse und des Elektronentransportes offen bleiben muß, spricht der bei der Freisetzung beobachtete ATP-Verbrauch ebenfalls dafür, daß durch Aminoadamantane eine Release-Reaktion induziert werden kann. Einschränkend muß jedoch erwähnt werden, daß nach DA PRADA und PLETSCHER (1968) allein die Temperaturabhängigkeit der Serotoninfreisetzung aus den Organellen nicht ausreicht, um die Abhängigkeit von metabolischer Energie und damit einen aktiven Prozeß zu beweisen. Auch physikochemische Veränderungen in der Organellenmembran können die Tem-

peraturabhängigkeit bedingen.

Für die Freisetzungsreaktion durch 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177) muß man, wie beim 1-Amino-3.5-dimethyladamantan (D 145), wahrscheinlich eine Release-Reaktion mit langsamem Zeitverlauf ohne Zellzerstörung annehmen. Dies dürfte auch für 1-Aminoadamantan gelten. Auf welche Weise diese Release-Reaktion jedoch induziert wird, bleibt offen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Aus menschlichen Thrombozyten wurden durch 1-Aminoadamantan (D 1) und durch 1-Amino-3-isopropyladamantan (D 177) dosisabhängig bis zu 75 % bzw. 95 % des gesamten Serotonins ausgeschüttet. Das Isopropylderivat D 177 setzt zunächst nur Serotonin, mit steigenden Konzentrationen jedoch zusätzlich die Adeninnukleotide ATP und ADP frei; d.h. es löst die von GRETTE (1962) erstmalig definierte "Release-Reaktion" aus. Durch 1-Aminoadamantan wurden keine Adeninnukleotide ausgeschüttet, was aber vermutlich dadurch bedingt ist, daß auf Grund schlechter Löslichkeit im verwendeten Inkubationsmedium nach GAINTNER (1962) eine genügend hohe Wirkstoffkonzentration nicht erreicht werden konnte. Hinsichtlich der Serotoninfreisetzung erwies sich D 177 als ein 10-fach stärkerer Induktor der Freisetzungsreaktion. In beiden Fällen besteht eine Zeit- wie Temperaturabhängigkeit der Reaktion; die kritische Mindesttemperatur beträgt dabei ungefähr 30°C; nach 30 Minuten ist die relativ langsam verlaufende Reaktion nahezu beendet. Eine Energieabhängigkeit der Freisetzung, wie sie von HOLMSEN et al. (1969) für die "Release-Reaktion" gefordert wird, konnte unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht nachgewiesen werden, da nach Blockierung der Glykolyse

mit Monojodacetat und des Elektronentransportes der Atmungskette durch Natriumcyanid vermehrt Serotonin im Inkubationsmedium nachgewiesen wurde, so daß nach anschließender Serotoninfreisetzung durch D 1 bzw. D 177 eine Differenzierung zwischen Freisetzungsreaktion und passivem Serotoninausstrom durch Hemmung des Energiestoffwechsels nicht möglich war. Ein unspezifisch zellzerstörender Effekt der beiden Aminoadamantane und eine nur dadurch bedingte Serotonin- und Adeninnukleotidfreisetzung konnten jedoch ausgeschlossen werden: 1. Die LDH-Aktivität im Thrombozytenüberstand steigt nach der Aminoadamantan-induzierten Freisetzungsreaktion nicht oder nicht signifikant an. 2. Der ATP/ADP-Quotient in intakten Thrombozyten (ATP : ADP = 1,5) unterscheidet sich von dem ATP/ADP-Verhältnis , das nach der D 177-induzierten Freisetzungsreaktion im Überstand gefunden wurde (ATP : ADP = 0,8). 3. Im elektronenmikroskopischen Bild konnte nach Inkubation mit 1-Aminoadamantan kein Membranschaden beobachtet werden.

1-Aminoadamantan (D 1) und D 177 hemmen die Serotonin-Aufnahme in menschliche Thrombozyten nicht-kompetitiv. Die Inhibitorkonstante für die Muttersubstanz beträgt $K_I = 1,3 \times 10^{-4}$ M; D 177 erwies sich als fast 10-fach stärkerer Hemmstoff mit einem K_I-Wert von $2,6 \times 10^{-5}$ M.

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
D 1	1-Aminoadamantan
D 145	1-Amino-3.5-dimethyladamantan
D 176	1-Amino-3-methyladamantan
D 177	1-Amino-3-isopropyladamantan
D 178	1-Amino-3-butyladamantan
5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
PCA	Perchlorsäure
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvatkinase
PRP	Plättchen reiches Plasma
$s_{\bar{x}}$	Standardfehler des arithmetischen Mittels
UpM	Umdrehungen pro Minute
ZpM	Zerfälle pro Minute

LITERATUR

BEHNKE, O.: An electron microscope study of the megacaryocyte of the rat bone marrow
J. Ultrastructural Research 24, S. 412-433 (1967)

BEHNKE, O., ZELANDER, T.: Filamentous substructure of microtubules of the marginal bundle of mammalian blood platelets
J. Ultrastructural Research 19, S. 147-165 (1967)

BERGMEYER, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse
Band I, 2. Auflage (1970)
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr.

BERNEIS, K.H., DA PRADA, M., PLETSCHER, A.: Micelle formation between 5-HT and adenosine triphosphate in platelet storage organelles
Science 165, S. 913-914 (1969)

BERNEIS, K.H., PLETSCHER, A., DA PRADA, M.: Phase separation in solutions of noradrenaline and adenosine triphosphate: influence of bivalent cations and drugs
Br. J. Pharmac. 39, S. 382-389 (1970)

BIZZOZERO, G. (1882): zitiert nach JOHNSON, S.A.: The circulating platelet (1971), S. 3
Academic Press, New York and London

BORN, G.V.R., INGRAM, G.I.C., STACEY, R.S.: The relationship between 5-hydroxytryptamine and adenosine triphosphate in blood platelets
Br. J. Pharmac. 13, S. 62-64 (1958)

BORN, G.V.R.: Adenosine triphosphate in blood platelets
Biochemical Journal 62, 33P (1956)

BORN, G.V.R., GILLSON, R.E.: Studies on the uptake of 5-HT by blood platelets
J. Physiol. 146, S. 472-492 (1959)

BORN, G.V.R., SMITH, J.B.: Uptake, metabolism and release of (^{3}H)-adrenaline by human blood platelets
Br. J. Pharmac. 39, S. 765-778 (1970)

BOULLIN, D.J., O'BRIEN, R.A.: Accumulation of dopamine by blood platelets from normal subjects and Parkinsonian patients under treatment with L-DOPA
Br. J. Pharmac. 39, S. 779-788 (1970)

BRAY, G.A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter
Analytical Biochemistry 1, S. 279-285 (1960)

BUCZKO, W., DE GAETANO, G., GARATTINI, S.: Effect of fenfluramine on 5-hydroxytryptamine uptake and release by rat blood platelets
Br. J. Pharmac. 53, S. 563-568 (1975)

DANIELCZYK, W.: Die Behandlung von akinetischen Krisen
Med. Welt, S. 1278-1282 (1973)

DA PRADA, M., TRANZER, J.P., PLETSCHER, A.: Effect of drugs and cations on ultrastructure and 5-HT content of blood platelets
J. Pharmac. Exp. Therap. 158/3, S. 394-398 (1967)

DE LANGE (1912): zitiert nach MAUPIN, B.: Blood platelets in man and animals, S. 2
Volume I, First edition (1969), Pergamon Press

DI GUGLIELMO (1917): zitiert nach MAUPIN, B.: Blood platelets in man and animals, S. 2
Volume I, First edition (1969), Pergamon Press

DIXON, M.: The determination of enzyme inhibitor constants
Biochemical Journal 55, S. 170 (1953)

DONNÉ (1840): zitiert nach MAUPIN, B.: Blood platelets in man and animals, S. 1
Volume I, First edition (1969), Pergamon Press

EDER, M., GEDIGK, P.: Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie (1974)
29. Auflage,Springer Verlag Berlin Heidelberg New York

FEISSLY (1922-1923): zitiert nach MAUPIN, B.: Blood platelets in man and animals, S. 2
Volume I, First edition (1969), Pergamon Press

FONIO (1912/13): zitiert nach MAUPIN, B.: Blood platelets in man and animals, S. 2
Volume I, First edition (1969), Pergamon Press

GAARDER, A., JONSON, J., LALAND, S., HELLEM, A.J., OWREN, P.A.: Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets
Nature (London) 192, S. 531-532 (1961)

DA PRADA, M., PLETSCHER, A.: Isolated 5-hydroxytryptamine organelles of rabbit blood platelets: physiological properties and drug-induced changes
Br. J. Pharmac. 34, S. 591-597 (1968)

DA PRADA, M., PLETSCHER, A., TRANZER, J.P., KNUCHEL, H.: Action of reserpine on subcellular 5-hydroxytryptamine organelles of blood platelets
Life Sciences part I 17, S. 477-480 (1968)

DA PRADA, M., TRANZER, J.P., PLETSCHER, A.: Storage of 5-HT in human blood platelets
Experientia 28 (11), S. 1328-1329 (1972 (b)

DAVIES, W.L., GRUNERT, R.R., HAFF, R.F., MC GAHEN, J.W., NEUMAYER, E.M., PAULSHOCK, M., WATTS, J.C., WOOD, T.R., HERMANN, E.C., HOFFMANN, C.E.: Antiviral activity of 1-adamantanamine
Science 144, S. 862-863 (1964)

DAY, H.J., HOLMSEN, H., HOWIG, T.: Subcellular particles of human blood platelets. A biochemical and electron-microscopic study with reference to the influence of fractionation techniques
Scand. J. Haemat. 8 (Suppl.): 7 (1969)

DEKHUYZEN (1901): zitiert nach MAUPIN, B.: Blood platelets in man and animals, S. 1
Volume I, First edition (1969), Pergamon Press

GALBRAIGHT, W.A., OXFORD, J.S., SCHILD, G.C., WATSON, G.I.: Protective effect of 1-adamantane hydrochloride on influenza A_2 infections in the family environment
Lancet 15, S. 1026-1028 (1969)

GAINTNER, J.R., JACKSON, D.P., MAYNERT, E.W.: The action of thrombin on platelet 5-hydroxytryptamine
Bullet of the Johns Hopkins Hospital 111, S. 185 (1962)

GOODE, D.J., MELTZER, H.Y.: Cytotoxic effects of imipramine on platelets
Biochemical Pharmacology 23, S. 2629-2635 (1974)

GOVAERTS und ROSKAM (1921): zitiert nach MAUPIN, B.: Blood platelets in man and animals,S. 2
Volume I, First edition (1969), Pergamon Press

GRELAK, R.P., CLARK,R., STUMP, J.P., VERNIER, V.G.: Amantadine-dopamine interaction: Possible mode of action in Parkinsonism
Science 169, S. 203-204 (1970)

GRETTE, K.: Studies on the mechanism of thrombin-catalyzed hemostatic reaction in blood platelets
Acta Physiol. Scand. (Suppl.) 195, (1962)

HAACKE, U., WESEMANN, W.: Induction of the platelet release reaction by 1.3-dimethhyl-5-aminoadamantane, a new adamantane derivative
Thromb. Diathes. haemorrh. 37(1), S. 62-72 (1977)

HARDISTY, R.M., STACEY, R.S.: 5-hydroxytryptamine in normal human blood platelets
J. Physiol. 130, S. 711-720 (1955)

HAYEM, G. (1878): zitiert nach JOHNSON, S.A.: The circulating platelet (1971), S. 3
Academic Press, New York and London

HELLEM, A.L. (1960): zitiert nach JOHNSON, S.A.: The circulating platelet (1971), S. 5
Academic Press, New York and London

HOLMSEN, H., HOLMSEN, I., BERNHARDSEN, A.: Microdetermination of adenosine diphosphate and adenosine triphosphate in plasma with the firefly luciferase system
Analytical Biochemistry 17, S. 456-473 (1966)

HOLMSEN, H., DAY, H.J.: Adenine nucleotide metabolism of blood platelets: IV. Subcellular localisation of nucleotide pools with different function in the platelet release reaction
Biochimica et Biophysica Acta 186, S. 254-266 (1969)

HOLMSEN, H., DAY, H.J., STORMORKEN, H.: The blood platelet release reaction
Scand. J. Haemat. Suppl. 8 (1969)

HOLMSEN, H., DAY, H.J.: The selectivity of the thrombin-induced platelet release reaction: subcellular localisation of released and restained constituents
J. of Lab. + Clin. Med. 95, S. 840-854 (1970)

HOLMSEN, H., STORM, E., DAY, H.J.: Determination of ATP and ADP in blood platelets. A modification of the firefly luciferase assay for plasma
Analytical Biochemistry 46, S. 489-501 (1971)

HOLMSEN, H. DAY, H.J. (1971): zitiert nach O'BRIEN, I.R.: ed. Clinics in haematology, Vol. 1,2 (1972)
W.B. Saunders, London, Philadephia, Toronto

HOLMSEN, H., OSTVOLD, A.C., DAY, H.J.: Behaviour of endogenous and newly absorbed serotonin in the platelet release reaction
Biochemical Pharmacology 22, S. 2599-2608 (1973)

KOWALSKI, E., KOPEC, M., WEGRZYNOWICZ, Z.: zitiert nach KOWALSKI, E., NIEWIAROWSKI, S.: Biochemistry of blood platelets (1967), S. 4
Academic Press, London and New York

KUSCHINSKY, G., LÜLLMANN, H.: Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie (1976), S. 86
7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

LEMMER, B.: Effects of amantadine and amphetamine on serotonin uptake and release by human blood platelets
Eur. J. Pharmac. 21(2), S. 183-188 (1973)

LINEWEAVER, H., BURK, D.: The determination of enzyme dissociation constants
J. Am. Chem. Soc. 56, S. 658-666 (1934)

MAASSAB, H.F., COCHRAN, K.W.: Rubella virus: Inhibition in vitro by amantadine hydrochloride
Science 145, S. 1443 (1964)

MASSINI, P.: Specifis activity of ^{14}C-labelled serotonin released from human blood platelets
Experientia 26, S. 87 (1970)

MAUPIN, B.: Blood platelets in man and animals
Volume I, First edition (1969), Pergamon Press

MÜRER, E.H., DAY, H.J., LIEBERMANN, J.E.: Metabolic aspects of the secretion of stored compounds from blood platelets. III. Effect of NaF on washed platelets
Biochimica et Biophysica Acta 362, S. 266-275 (1974)

MUSCHALEK, G.: Induktion der Freisetzungsreaktion und Hemmung der 5-HT-Aufnahme in menschliche Thrombozyten durch Aminoadamantane
Dissertation aus dem Physiologisch-Chemischen Institut Marburg (1977)

NAKAO, K., ANGRIST, A.A.: Membrane surface specialisation of blood platelet and megacaryocyte
Nature 217, S. 960-961 (1968)

OSLER, W. (1874): zitiert nach JOHNSON, S.A.: The circulating platelet (1971), S. 2
Academic Press, New York and London

PAASONEN, M.K., PLETSCHER, A.: Increase of free 5-hydroxytryptamine in blood platelets by reserpine and a benzoquinoline derivative
Experientia 15, S. 477- 479 (1959)

PAASONEN, M.K., (1964): zitiert nach PAASONEN, M.K., ATHEE, L., SOLATUNTURI, E.: Blood platelets as a model for monoaminergic neurons, S. 272
Progr. Brain Res. 34, S. 269-279 (1971)

PAASONEN, M.K., ATHEE, L., SOLATUNTURI, E.: Blood platelets as a model for monoaminergic neurons
Progr. Brain Res. 34, S. 269-279 (1971)

PIPER, W.: Innere Medizin (1974), S. 418
Springer Verlag Heidelberg

PLETSCHER, A., BURKHARD, W., TRANZER, J.P., GRAY, K.F.: Two sites of 5-hydroxytryptamine uptake in blood platelets
Life Science 6, S. 273-280 (1967)

PLETSCHER, A., TRANZER, J.P.: Action of reserpine and imipramine on intracellular storage of 5-hydroxytryptamine in blood platelets
Experientia 23, S. 289-291 (1967)

PLETSCHER, A.: Metabolism, transfer and storage of 5-hydroxytryptamine in blood platelets
Br. J. Pharmac. + Chemoth. 32, S. 1-16 (1968)

PLETSCHER, A., DA PRADA, M., BERNEIS, K.H., TRANZER, J.P.: New aspects on the storage of 5-hydroxytryptamine in blood platelets
Experientia 27, S. 993-1002 (1971)

RAPPORT, M.: Serum vasoconstrictor (Serotonin). V. The presence of creatinin in thr complex: a proposed study of the vasoconstrictor principle
J. Biol. Chem. 180, S. 961-969 (1948)

REBUCK, J.W., RIDDLE, J.M., BROWN, M.G., JOHNSON, S.A., MONTO, R.W. (1961): zitiert aus "The Blood Platelets" (S.A. JOHNSON et al, eds),
Little, Brown, Boston, Massachusetts

RINEHART (1955): zitiert nach MAUPIN, B.: Blood platelets in man and animals, S.76
Volume I, First edition (1969), Pergamon Press

SCATTON, B., CHERAMY, A., BESSON, M.J., GLOWINSKY, J.: Increased synthesis and release of dopamine in the striatum of the rat after adamantanamine-treatment
Europ. J. Pharmac. 13, S. 131-133 (1970)

SCHWAB, R.S., ALBERT, C., DAVID, C., YONG, R.R.: Amantadine in the treatment of Parkinson's disease
J. of Am. Med. Ass. 208, S. 1168-1170 (1969)

STACEY, R.S.: Uptake of 5-hydroxytryptamine by platelets
Br. J. Pharmac. 16, S. 284-295 (1961)

SZABADOS, L., MESTER, L.: Accelerated uptake of 5-hydroxytryptamine by human blood platelets enriched in a sialic acid
Biochemical Journal 148, S. 335-336 (1975)

TRANZER, J.P., DA PRADA, M., PLETSCHER, A.: Ultrastructural localisation of 5-hydroxytryptamine in blood platelets
Nature 212, S. 1574-1575 (1966)

TRANZER, J.P., PLETSCHER, A., DA PRADA, M.: Speicherung von 5-Hydroxytryptamin in submikroskopischen Organellen der Blutplättchen
Helv. Physiol. Pharmacol. Acta 24, C108-C110 (1966(b)

TRANZER, J.P., DA PRADA, M., PLETSCHER, A.: Electron microscopic study of the storage site of the 5-hydroxytryptamine in blood platelets
Adv. in Pharmac. part A6, S. 125-128 (1967)

VIRCHOW, R.: Die Cellularpathologie in Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre
Hirschwald, Berlin (1858)

WESEMANN, W., SCHOLLMEYER, J.D.: Biochemical effects of adamantanamines, a new class of drugs with antiparkinson activity
Agents and Actions 3, S. 195 (1973)

WESEMANN, W. WILDENHAHN, G.: Electrical and drug induced release of 5-HT from isolated nerve endings
5th International Meeting of the I.S.N. (1975)
Abstr. Nr. 39

WILDENHAHN, G.: Untersuchungen zur Aufnahme und Verteilung des Serotonins in Synaptosomen
Dissertation aus dem Physiologisch-Chemischen Institut Marburg (1976)

WOLPERS, C., RUSKA, H. (1939): zitiert nach JOHNSON, S.A.: The circulating platelet (1971), S. 4
Academic Press, New York and London

WRIGHT, J.H.: Origin and nature of the blood platelets
Boston, Massachusetts (1906)

ZIMMERMANN (1847): zitiert nach MAUPIN, B.: Blood platelets in man and animals, S. 1
Volume I, First edition (1969), Pergamon Press

Herrn Prof. Wesemann danke ich für die freundliche Überlassung des Themas der Arbeit und die mir entgegengebrachte Unterstützung.

Vielen Dank auch den Mitarbeitern des Labors, insbesondere Frau Süwer für Ratschläge und Hilfe und Herrn Stachora für das Fotographieren der Zeichnungen.

Lebenslauf

Am 8. 10. 1952 wurde ich als erster Sohn des Diplom-Ingenieurs Hans-Georg Stöltzing und seiner Ehefrau Waltraud, geb. Günther, in Niederpöcking/Krs. Starnberg geboren. Nach mehreren Schulwechseln in der Grundschule und am Anfang der Gymnasialzeit, besuchte ich ab der Quarta das Theodor-Heuss-Gymnasium in Heilbronn/Neckar, unterbrochen durch einen einjährigen Aufenthalt als Austauschschüler in den U.S.A.. 1970 legte ich in Heilbronn die Reifeprüfung ab. Im Wintersemester 1970 begann ich in Marburg Medizin zu studieren, es folgten das Vorphysikum im Sommersemester 1971 und das Physikum im Sommersemester 1973. Im Dezember 1976 bestand ich in Marburg das Staatsexamen. Seit April 1977 bin ich als Medizinalassistent, zuerst im Pathologischen Institut, und jetzt in der Chirurgischen Klinik Marburg tätig.

Hartmut Stöltzing

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Amon, Prof. Aurich, Prof. Aziz, Prof. Baltzer, Dr. Börgnen, Prof. Bode, Prof. Braasch, Prof. Buchholz, Prof. Castenholz, Prof. Daume, Prof. Dehnicke, Prof. Dimroth, Prof. Dittrich, Prof. Dombrowski, Prof. Eissner, Prof. Egbring, Prof. Eschenbach, Prof. Exner, Dr. Frank, Dr. Frenzel, Prof. Friedrich, Prof. Gallwitz, Prof. Ganz, Prof. Gerdes, Dr. Glanz, Dr. Gloor, Prof. Golenhofen, Prof. Haberich, Prof. Hamelmann, Prof. Hardewig, Prof. Havemann, Prof. Hensel, Prof. Hering, Prof. Hess, Prof. Hildebrandt, Prof. Hilgermann, Prof. Hort, Prof. Huch, Prof. Jacob, Prof. Kaffarnik, Prof. Kalbfleisch, Prof. Karlson, Prof. Klaus, Prof. Kleinsasser, Prof. Koecke, Prof. Koransky, Prof. Lange, Dr. Langer, Prof. Lauer, Prof. Lütcke, Prof. Mannheim, Prof. Maroske, Prof. Martini, Prof. Neurath, Prof. Oepen, Prof. Petry, Prof. Pots, Prof. Remschmidt, Prof. Richter (Chir.), Prof. Richter (Physik), Prof. Riecken, Prof. Rodeck, Prof. Rohen, Prof. Schachtschabel, Prof. Schiff, Prof. Schmid, Prof. Schmitz-Moormann, Prof. Schneider, Prof. Seidel, Prof. Siegert, Prof. Straub, Prof. Thoenes, Prof. Wehrmeyer, Prof. Welge-Lüßen, Prof. Wendt, Prof. Wesemann, Prof. Wiegand, Prof. Willenbockel.